



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de los extractos de Schkuhria pinnata y Baccharis latifolia**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

### **AUTORES**

Aldo BENITO NAVARRO

Fiorella DE LA CRUZ TITO

### **ASESORES**

Mg. Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ

Dr. Américo Jorge CASTRO LUNA (Co-asesor)

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Benito, A. & De la Cruz, F. Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional): -

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (asesor): 000-0003-4176-1618

Dr. Américo Jorge Castro Luna (co-asesor): 0000-0001-8012-967X

DNI del autor: 70241737

Grupo de investigación: -

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: -

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas:

Distrito de Ambo, Huánuco: 10°08'00"S 76°12'00"O

Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Laboratorio farmacéutico Pharmadix Corp. S.A.C.: 12°03'00"S 77°02'00"O

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2018

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional): -

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (asesor): 000-0003-4176-1618

Dr. Américo Jorge Castro Luna (co-asesor): 0000-0001-8012-967X

DNI del autor: 48040822

Grupo de investigación: -

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: -

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas:

Distrito de Ambo, Huánuco: 10°08'00"S 76°12'00"O

Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Laboratorio farmacéutico Pharmadix Corp. S.A.C.: 12°03'00"S 77°02'00"O

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2018



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE  
*Schkuhria pinnata* Y *Baccharis latifolia***

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**FIGRELLA DE LA CRUZ TITO Y  
ALDO BENITO NAVARRO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Diecinueve (19) Con Mención

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 19 de julio de 2019.

  
Dr. César Máximo Fuertes Ruitón  
Presidente

  
Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha  
Miembro

  
Mg. Francisco Javier María Ramírez Cruz  
Miembro

  
Mg. Walter Rivas Altez  
Miembro

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**



**DEDICATORIA:**

Fiorella de la Cruz Tito

A Dios:

Por brindarme la luz del camino correcto, guiarme en cada paso, protegerme  
de las adversidades y hacerme más fuerte.

A mis padres Alejandro y Sonia:

Por su gran amor, compañía y sacrificios a lo largo de estos años; por creer  
en mis sueños y su apoyo incondicional, les debo la vida entera.

A mis hermanos Alejandro, Juan Carlos y Guisella:

Por ser fuente de mi inspiración y aspirar a grandes metas, aun si lo creía  
imposible, gracias por creer en mí.

Al amor de mi vida Alonso:

Por tu apoyo y aliento cuando más lo he necesitado.

**DEDICATORIA:**

Aldo Benito Navarro

A Dios

Por iluminar mi camino y ayudarme a superar los diferentes obstáculos que se  
fueron presentando y a nunca rendirme.

A mi familia

Por ser mi soporte emocional y económico y estar siempre ahí para apoyarme  
durante mi crecimiento tanto personal como profesional.



### **AGRADECIMIENTOS:**

Al Mg. Julio Ruiz por su apoyo, dedicación y amistad brindada, por compartir sus conocimientos y aconsejarnos en el camino de esta gran aventura.

Al Dr. Américo Castro, gracias por el impulso en esta gran aventura dentro de la investigación.

A todos los docentes de la facultad de Farmacia y Bioquímica por las experiencias compartidas, enseñanzas, consejos, conocimientos brindados para impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

Finalmente agradecemos al Jurado Examinador por la revisión exhaustiva que han realizado al presente texto y por sus valiosos aportes en el mismo.

# ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. OBJETIVO GENERAL .....	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
1.3. HIPÓTESIS.....	2
II. GENERALIDADES.....	3
2.1. ANTECEDENTES.....	3
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA <i>ASTERACEAE</i> .....	9
2.2.1. GÉNERO <i>SCHKUHRIA</i> .....	10
2.2.2. GÉNERO <i>BACCHARIS</i> .....	14
2.3. TERPENOS.....	20
2.3.1. MONOTERPENOS.....	22
2.3.2. SESQUITERPENOS .....	24
2.3.3. TRITERPENOS Y ESTEROIDES.....	26
2.4. POLIFENOLES O FENOLES CARBOXILADOS.....	28
2.4.1. ÁCIDOS FENÓLICOS SIMPLES.....	30
2.4.2. CUMARINAS.....	30
2.4.3. QUINONAS .....	31
2.4.4. FLAVONOIDES.....	32
2.5. ANTIOXIDANTES.....	35
2.5.1. CLASIFICACIÓN.....	36
2.5.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	36
2.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	38
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	40
3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	40

3.1.1. MATERIALES BIOLÓGICOS .....	40
3.1.2. MATERIALES.....	40
3.1.3. EQUIPOS.....	41
3.1.4. REACTIVOS .....	41
3.2. ENTIDADES DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN.....	42
3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	43
3.4. FLUJOGRAMA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.....	43
3.5. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL .....	43
3.6. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS .....	44
3.7. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO .....	44
3.8. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO .....	44
3.9. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU .....	45
3.9.1. FUNDAMENTO .....	45
3.9.2. PROCEDIMIENTO .....	46
3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	47
3.10.1. MÉTODO 2,2-DIFENIL1-PICRILHIDRAZIL (DPPH) .....	47
3.10.2. MÉTODO 2,2-AZINO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-ÁCIDO SULFÓNICO (ABTS <sup>•+</sup> )).....	50
3.11. MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA ANÁLISIS .....	52
3.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN COLORIMÉTRICA .....	52
3.12.1. FUNDAMENTO .....	52
3.12.2. MICROORGANISMOS DE ESTUDIO .....	53
3.12.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO .....	53
3.12.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	54
3.12.5. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES .....	55
3.12.6. SEMBRADO EN LAS MICROPLACAS.....	56

3.12.7. LECTURA DE RESULTADOS.....	57
3.12.8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	57
IV. RESULTADOS.....	58
4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS.....	58
4.2. SCREENING FITOQUÍMICO.....	59
4.3. POLIFENÓLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.....	60
4.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	61
4.4.1. MÉTODO 2,2-DIFENIL1-PICRILHIDRAZIL (DPPH) .....	61
4.4.2. MÉTODO 2,2-AZINO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-ÁCIDO SULFÓNICO) (ABTS <sup>•+</sup> ).....	65
4.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	68
V. DISCUSIÓN.....	75
VI. CONCLUSIONES .....	81
VII. RECOMENDACIONES .....	82
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
IX. ANEXOS.....	97

## **ABREVIATURAS**

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

**OPS:** Organización Panamericana de Salud.

**DPPH:** 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2-difenil1-picrilhidrazilo).

**ABTS·<sup>+</sup>:** 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico).

**IC<sub>50</sub>:** Concentración media inhibitoria máxima.

**TEAC:** Actividad equivalente a trolox en µg/µg muestra.

**% CSRL:** Porcentaje de captación de radicales libres.

**EROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**RFC:** Reactivo de Folin-Ciocalteu.

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**EC<sub>50</sub>:** Concentración media efectiva.

**CMI:** Concentración mínima que inhibe del crecimiento de bacterias y hongos.

**CSP:** Concentración suficiente para llevar a volumen.

**DE:** Desviación estándar.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de las especies de la familia <i>Asteraceae</i> en el Perú, mayor presencia en las zonas Chachapoyas-Huánuco (rojo) y Lima-Piura (amarillo) <sup>31</sup> .	9
<b>Figura 2.</b> Planta adulta de <i>Schkuhria pinnata</i> (Lanm.) Kuntze ex Thell (Fotografía tomada en el Distrito de Ambo, Huánuco).	12
<b>Figura 3.</b> Especie vegetal <i>Schkuhria pinnata</i> (Lanm.) Kuntze ex Thell. Fuente: Herbarium Field Museum <sup>39</sup> .	13
<b>Figura 4.</b> Especie vegetal <i>Baccharis latifolia</i> (R & P) Pers. Fuente: Herbarium Field Museum <sup>39</sup> .	17
<b>Figura 5.</b> Origen y síntesis de los terpenos y sus precursores <sup>58</sup> .	21
<b>Figura 6.</b> Principales esqueletos monoterpénicos <sup>58</sup> .	23
<b>Figura 7.</b> Reacciones de interconversión del catión bisabolilo para la obtención de esqueletos principales sesquiterpénicos <sup>58</sup> .	25
<b>Figura 8.</b> Estructuras básicas de triterpenos y esteroides <sup>58</sup> .	27
<b>Figura 9.</b> Ruta de la biosíntesis de los polifenoles <sup>73</sup> .	29
<b>Figura 10.</b> Principales estructuras de los grupos de polifenoles que derivan del núcleo principal <sup>74</sup> .	29
<b>Figura 11.</b> Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos <sup>74</sup> .	30
<b>Figura 12.</b> Estructura de los ácidos hidroxicinámicos <sup>74</sup> .	30
<b>Figura 13.</b> Estructura de una cumarina “2H-1-benzopiran-2-ona” <sup>74</sup> .	31
<b>Figura 14.</b> Estructura de una quinona <sup>74</sup> .	32
<b>Figura 15.</b> Estructura básica de un flavonoide <sup>74</sup> .	32
<b>Figura 16.</b> Estructura de las flavanonas y flavononoles <sup>74</sup> .	33
<b>Figura 17.</b> Estructura de las isoflavonas y neoflavonoides <sup>74</sup> .	33
<b>Figura 18.</b> Estructura de las catequinas <sup>74</sup> .	34
<b>Figura 19.</b> Estructura de las antocianidinas <sup>74</sup> .	34
<b>Figura 20.</b> Mecanismo de acción general de los antioxidantes frente a los radicales libres <sup>83</sup> .	35
<b>Figura 21.</b> Estrés oxidativo <sup>88</sup> .	37
<b>Figura 22.</b> Diagrama de flujo de la metodología.	43
<b>Figura 23.</b> Reacción química del reactivo Folin-Ciocalteu.	45

<b>Figura 24.</b> Reacción química entre el radical DPPH y una sustancia antioxidante donadora de electrones.....	47
<b>Figura 25.</b> Reacción química entre el radical ABTS y la especie donante de electrones. ....	50
<b>Figura 26.</b> Esquema de dilución del inóculo de bacterias.....	53
<b>Figura 27.</b> Esquema de dilución del inóculo de hongos.....	54
<b>Figura 28.</b> Curva de calibración del ácido gálico, eje abscisas (x) concentración del estándar y eje ordenadas (y) absorbancia medida a 765 nm. ....	61
<b>Figura 29.</b> Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> .....	62
<b>Figura 30.</b> Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> . ....	63
<b>Figura 31.</b> Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del estándar trolox. ....	64
<b>Figura 32.</b> Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> . ....	66
<b>Figura 33.</b> Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> . ....	67
<b>Figura 34.</b> Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS del trolox (patrón).....	68
<b>Figura 35.</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de <i>Schkuhria pinnata</i> (S.p), <i>Baccharis latifolia</i> (B.l) y estándar de eritromicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento. ..	69
<b>Figura 36.</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de <i>Schkuhria pinnata</i> (S.p), <i>Baccharis latifolia</i> (B.l) y estándar de eritromicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a <i>Staphylococcus</i>	

<i>epidermidis</i> ATCC 12228, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.....	70
<b>Figura 37.</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de <i>Schkuhria pinnata</i> (S.p), <i>Baccharis latifolia</i> (B.l) y estándar de gentamicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8731, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.....	71
<b>Figura 38.</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de <i>Schkuhria pinnata</i> (S.p), <i>Baccharis latifolia</i> (B.l) y estándar de gentamicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.....	72
<b>Figura 39.</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de <i>Schkuhria pinnata</i> (S.p), <i>Baccharis latifolia</i> (B.l) y estándar de fluconazol (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento. ....	73
<b>Figura 40.</b> Comparación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de <i>Schkuhria pinnata</i> (A) y <i>Baccharis latifolia</i> (B) contra <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> . ....	74
<b>Figura 41.</b> Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> . ....	97
<b>Figura 42.</b> Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> (continuación). ....	97
<b>Figura 43.</b> Reacción de Shinoda para reconocimiento de flavonoides del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> . ....	97
<b>Figura 44.</b> Marcha fitoquímica del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> . ....	98
<b>Figura 45.</b> Marcha fitoquímica del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (continuación). ....	98
<b>Figura 46.</b> Reacción de Shinoda para reconocimiento de flavonoides del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> .....	98



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los flavonoides con mayor importancia terapéutica. ....	33
<b>Tabla 2.</b> Marcha fitoquímica para la identificación de principales metabolitos secundarios. ....	44
<b>Tabla 3.</b> Dilución del estándar de ácido gálico. ....	46
<b>Tabla 4.</b> Dilución del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> : método DPPH. ....	48
<b>Tabla 5.</b> Dilución del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> : método DPPH. ....	48
<b>Tabla 6.</b> Dilución del estándar: método DPPH. ....	49
<b>Tabla 7.</b> Dilución de los extractos método ABTS <sup>•+</sup> ....	51
<b>Tabla 8.</b> Dilución del estándar método ABTS <sup>•+</sup> ....	51
<b>Tabla 9.</b> Esquema de trabajo de las diluciones de los extractos. ....	54
<b>Tabla 10.</b> Dilución del estándar de Gentamicina ....	55
<b>Tabla 11.</b> Dilución del estándar de Eritromicina ....	55
<b>Tabla 12.</b> Dilución del estándar de Fluconazol ....	56
<b>Tabla 13.</b> Esquema de trabajo de las proporciones para inocular en los pocillos con inóculo bacteriano. ....	56
<b>Tabla 144.</b> Esquema de trabajo de las proporciones para inocular en los pocillos con inóculo fúngico. ....	57
<b>Tabla 15.</b> Características organolépticas de los extractos en estudio. ....	58
<b>Tabla 16.</b> Solubilidad de los extractos secos en estudio. ....	58
<b>Tabla 17.</b> pH de los extractos en estudio. ....	59
<b>Tabla 18.</b> Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> . ....	59
<b>Tabla 19.</b> Marcha fitoquímica del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> . ....	60
<b>Tabla 20.</b> Resultados de absorbancia de ácido gálico. ....	60
<b>Tabla 21.</b> Resultados obtenidos equivalente mg ácido gálico/mg muestra. ....	61
<b>Tabla 22.</b> Resultados del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> : método DPPH. ..	62
<b>Tabla 23.</b> Resultados del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> : método DPPH. ....	63
<b>Tabla 24.</b> Resultados del trolox (patrón) por el método DPPH. ....	64
<b>Tabla 25.</b> Resultados expresados en IC <sub>50</sub> y TEAC por el método DPPH. ....	65
<b>Tabla 26.</b> Resultados del extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> : método ABTS <sup>•+</sup> . 65	

<b>Tabla 27.</b> Resultados del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> : método ABTS <sup>•+</sup> . .....	66
<b>Tabla 28.</b> Resultados del trolox por método ABTS <sup>•+</sup> .....	67
<b>Tabla 29.</b> Resultados expresados en IC <sub>50</sub> y TEAC por el método ABTS <sup>•+</sup> .....	68
<b>Tabla 30.</b> Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Schkuhria pinnata</i> y <i>Baccharis latifolia</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Candida albicans</i> . .....	74

## RESUMEN

La presente investigación experimental tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante *in vitro* de los extractos metanólico de *Schkuhria pinnata* e hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*, obtenidos de la Provincia de Ambo, Región Huánuco. Ambos extractos se obtuvieron mediante maceración y posterior liofilización, procediendo luego a realizarles la marcha fitoquímica, encontrándose presencia de fenoles, lactonas, terpenos y flavonoides para ambas especies; así como naftoquinonas y antraquinonas para la especie *Baccharis latifolia*, y saponinas triterpenoides para la especie *Schkuhria pinnata*. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método de microdilución colorimétrica frente a las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8731, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* ATCC 10231; los resultados se evaluaron mediante la determinación de la CMI. El extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* presentó una CMI de 2000 µg/mL y el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* una CMI de 62.5 µg/mL tanto contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Por otra parte, se cuantificaron los polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, obteniendo una mayor cantidad en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* equivalente a 9,98 mg ácido gálico/mg muestra. Por último, la actividad antioxidante se evaluó mediante el método del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo) y ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico); los resultados se expresaron por medio del valor IC<sub>50</sub>. El extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* presentó mayor IC<sub>50</sub> (64.70 µg/mL y 501,09 µg/mL en los respectivos métodos), encontrándose diferencia significativa en los resultados obtenidos para actividad antioxidante entre los extractos y el estándar de trolox.

**Palabras clave:** *Schkuhria pinnata*, *Baccharis latifolia*, antimicrobiano, antioxidante, polifenoles

## ABSTRACT

The objective of the present experimental research was to evaluate the *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of the methanolic extract of *Schkuhria pinnata* and the hydroalcoholic extract of *Baccharis latifolia*, obtained from the Province of Ambo, Huánuco Region. Both extracts were obtained by maceration and subsequent lyophilization, proceeding then to perform the phytochemical screening, finding presence of phenols, lactones, terpenes and flavonoids for both species; as well as naphthoquinones and anthraquinones for the species *Baccharis latifolia*, and triterpenoids saponines for the species *Schkuhria pinnata*. The antimicrobial activity was determined using the colorimetric microdilution method against the strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8731, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC 10231; the results were evaluated by determining the MIC. The methanolic extract of *Schkuhria pinnata* presented a MIC of 2000 µg/mL and the hydroalcoholic extract of *Baccharis latifolia* a MIC of 62.5 µg/mL both against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. On the other hand, the total polyphenols were quantified by the Folin-Ciocalteu method, obtaining a great quantity in the hydroalcoholic extract of *Baccharis latifolia* equivalent to 9.98 mg gallic acid/mg sample. Finally, the antioxidant activity was evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) and ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) free radical method, the results were expressed by means of the IC<sub>50</sub> value. The hydroalcoholic extract of *Baccharis latifolia* showed higher IC<sub>50</sub> (64.70 µg/mL and 501.09 µg/mL in the respective methods).

**Key words:** *Schkuhria pinnata*, *Baccharis latifolia*, antimicrobial, antioxidant, polyphenols.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Desde tiempos remotos, las plantas medicinales han estado ligadas con la historia del hombre; sin embargo, no fue sino hasta los siglos XVII y XVIII en los que se llegó al apogeo de su uso con fines curativos. Tras ello, en el siglo XX, el surgimiento de la industria farmacéutica, gracias a la innovación tecnológica y el desarrollo de nuevos conocimientos, sustituyó las plantas medicinales y productos naturales por productos sintéticos. No obstante, en la actualidad se evidencia un marcado aumento en el uso de productos naturales. En consecuencia, según cálculos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), dos tercios de la población mundial recurren al uso de plantas medicinales<sup>1</sup>.

Al igual que con las plantas medicinales, la OMS viene desarrollando políticas y estrategias a ser aplicadas a nivel global sobre la medicina tradicional, cuyo uso e importancia económica vienen creciendo exponencialmente (mayormente en los países en vías de desarrollo). En regiones como África y América Latina, según datos de la OMS y la Organización Panamericana de Salud (OPS), un gran porcentaje de la población usa la medicina tradicional como sistema primario de tratamiento. Del mismo modo, el porcentaje de la población de los países desarrollados que utiliza la medicina tradicional viene creciendo rápidamente<sup>2</sup>.

Respecto al marco legal, cuenta con la Ley 28216, Ley de protección al acceso a la diversidad biológica peruana y a los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas<sup>3</sup>, la Ley 27811, la cual establece el régimen de protección de los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas vinculados a los recursos biológicos<sup>4</sup>, la Ley 27300, Ley de aprovechamiento sostenible de las plantas medicinales<sup>5</sup>, entre otras. Asimismo, es importante mencionar el Decreto Supremo N° 001-2003-SA, por el cual se aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud, teniendo dentro de su organigrama al Centro Nacional de Salud Intercultural (CENSI), el cual se encarga de elaborar y presentar información para el Inventario Nacional de Plantas Medicinales<sup>6</sup>.

### 1.1. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar los polifenoles totales y evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* y del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* y evidenciar sus metabolitos secundarios.
- Determinar los polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu en los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia*.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* por los métodos DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, calcular el IC<sub>50</sub> y TEAC mediante una curva de calibración del estándar trolox y comparar resultados.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* por el método de microdilución frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.
- Comparar la actividad antimicrobiana entre los extractos de *Schkuhria pinnata*, *Baccharis latifolia* y los antibióticos de referencia.

### 1.3. HIPÓTESIS

**H1:** El extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* tiene actividad antimicrobiana y antioxidante

**H2:** El extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* tiene actividad antimicrobiana y antioxidante

## II. GENERALIDADES

### 2.1. ANTECEDENTES

*Asteraceae*, antes conocida como *Compositae*, es la familia más amplia entre las Angiospermas, comprendiendo cerca de 1,100 géneros y 25,000 especies. Sus especies son extensamente investigadas debido a su composición bioquímica y potencial actividad biológica, razones por las que se han empleado en el desarrollo de nuevos fármacos, insecticidas, entre otros. Numerosos trabajos científicos realizados con especies de esta familia presentaron una composición variedad de metabolitos secundarios, destacando los polifenoles, flavonoides, fenoles, aceites volátiles (di-terpenos) y dos importantes marcadores quimiotaxonómicos: las lactonas sesquiterpénicas y los compuestos poliacetilenicos<sup>7, 8</sup>.

*Schkuhria pinnata*, también llamada canchalagua, es usada para el tratamiento de diferentes enfermedades como diabetes, malaria, enfermedades en el oído, nariz y garganta, fiebre e influenza, heridas, problemas de hígado y riñón, alergias, enfermedades por hongos, inflamación prostática, problemas del tracto digestivo y reumatismo<sup>9-11</sup>.

En un estudio de elucidación estructural, actividad antiparasitaria y citotóxica del extracto diclorometánico de las partes aéreas de *S. pinnata* realizado en Kenya, Suiza y Alemania (2018) fueron aislados cromatográficamente e identificados por RMN-H y HR/MS 20 lactonas sesquiterpénicas, entre ellas una eudesmanolida y dos germacranolidos; y dos flavonoides, pectolinarigenina y 3-hidroxi-4,5-dimetoxibenzenopropanol; además se atribuyó actividad prometedora contra *Trypanosoma brucei* (IC 50% de 0.64 µg/mL) y citotóxica contra células mamíferas<sup>11</sup>.

Se realizó un estudio experimental evaluando la actividad antimicrobiana del extracto acuoso y metanólico de *S. pinnata* en Zimbawe (2017), el cual tuvo como objetivo investigar el potencial uso de la caléndula enana (*Schkuhria pinnata*) en el control de patógenos de mastitis (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus agalactiae* y *Escherichia coli*). Se obtuvieron resultados significativos, pero no tan efectivos como la gentamicina. No existió diferencia significativa entre el extracto acuoso y metanólico,

así como en el uso de concentraciones de 40 %, 60 % y 100 %; además, la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* fue mayor al tener menor recuento microbiano que *S. aureus* y *S. agalactiae*<sup>12</sup>.

Por otro lado, en otro estudio experimental de la actividad antimicrobiana de *S. pinnata* realizado en Sudáfrica (2007), se evaluaron las actividades biológicas de las 10 plantas más usadas como remedios de medicina etnoveterinaria para tratar heridas y placenta retenida. Se encontró una gran actividad antimicrobiana del extracto crudo de *S. pinnata* en diclorometano y metanol al 90% frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* más no frente a *Pseudomonas aeruginosa*, evaluándolo frente a control positivo de neomicina; también se reportó actividad antiinflamatoria selectiva a la inhibición de COX-1 (> 60 %) lo que indica que su uso prolongado puede dañar el tracto gastrointestinal y no ha presentado actividad mutagénica en cultivos de *Salmonella typhimurium* (TA98)<sup>13</sup>.

Además, en un estudio experimental realizado en Sudáfrica (2007), se evaluó la actividad antibacteriana y antihelmíntica, y la toxicidad, de extractos de 17 plantas usadas para tratar diferentes enfermedades, los cuales se prepararon usando 3 solventes. Se halló actividad antimicrobiana significativa del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* frente a *Staphylococcus aureus* (Concentración Mínima Inhibitoria = CMI 1,6 mg/mL) y *Enterococcus faecalis* (CMI = 6,3 mg/mL) en comparación al extracto acuoso y en hexano, en los cuales el CMI es mayor a 12,5 mg/mL y no se ha demostrado efecto toxico *in vivo* de los extractos en *Artemia salina*, debido a la falta de correlación de los datos se sugiere realizar ensayos de citotoxicidad en líneas celulares<sup>14</sup>.

En un estudio experimental hecho en México (2009), se buscó caracterizar y evaluar la actividad antioxidante *in vivo* de los constituyentes de la planta *Schkuhria pinnata* var. *wislizeni*, los cuales se identificaron por medio de cromatografía líquida al vacío, realizando previamente una doble extracción con n-hexano y una extracción con acetona a temperatura ambiente de sus partes aéreas. Se obtuvieron lactonas sesquiterpénicas, flavonoides y acil fenil propanoides. Además, los resultados de la



actividad antioxidante se midieron en función de la inhibición del daño inducido por HAAP en homogenado pancreático de rata. Así, se determinó que la mezcla de los 2 acil fenil propanoides caracterizados mostraron actividad antioxidante a diferencia de las lactonas sesquiterpénicas caracterizadas, lo cual los identifica como agentes protectores contra la peroxidación de lípidos<sup>15</sup>.

*Baccharis obovata* es usada para tratar alopecia, caspa, diversas dermatitis, y cefaleas. Además, la emplean en la elaboración de yesos para fracturas, como vermífuga, antiinflamatoria, antitumoral y antiulcerosa<sup>16</sup>. *Baccharis obovata* se utiliza por infusión o decocción de hojas y tallos para tratar dolencia de mucosas<sup>17</sup>.

*Baccharis salicifolia* produce una resina en la que se han identificado flavonoides y éteres. En partes aéreas se han identificado diterpenos, ácidos y sus compuestos o derivados, sesquiterpenos, epóxidos, flavonoides, y una cumarina<sup>18</sup>.

En una revisión descriptiva hecha en Madrid (2007), se buscó describir los usos tradicionales y folclóricos de las plantas medicinales del género *Baccharis*, además de los reportes toxicológicos, farmacológicos, y de constituyentes fitoquímicos de especies prometedoras de dicho género. Así, por ejemplo, una infusión de hojas de la planta *Baccharis salicifolia* se aplica externamente como un remedio para la inflamación. Una cocción de sus hojas y tallos se ha utilizado como un agente higiénico femenino. Se investigaron los componentes volátiles de los aceites de las hojas en un estudio en la Patagonia argentina de la planta chilca y 3 especies más del género *Baccharis*. El rendimiento del aceite de la planta chilca fue de 1,50% y sus principales componentes fueron alfa-thujene (monoterpeno), alfa y beta pineno (monoterpenos), mirceno (monoterpeno), alfa felandreno (monoterpeno cíclico), limoneno (terpeno limonoide o tetranortriterpeno), beta ocimene (monoterpeno), terpinen-4-ol (monoterpeno), gamma cadineno (sesquiterpeno bicíclico) y elemol (alcohol cristalino). El aceite esencial de la chilca tiene efectos tóxicos y repelentes en *Tribolium castaneum*<sup>19</sup>.

En un estudio experimental realizado en Argentina (2009), se examinó el aceite esencial de la parte aérea de *Baccharis salicifolia*, el cual fue obtenido por

hidrodestilación por tres horas, siguiendo el método recomendado por la Farmacopea Británica (BP). La composición del aceite esencial determinado por cromatografía de gases acoplado a espectrofotómetro de masas (GC-MS) identificaron alfa-pineno, canfeno, beta-pineno, alfa-felandreno, alfa-cubebene, beta-cariofileno, 6,9-guaiadiene, germacreno D y germacrone<sup>20</sup>. Los flavonoides en género *Baccharis* se presentan generalmente en agliconas libres y raramente en la forma aglicosilada, casi el 50 % de flavonas son C-3 oxigenadas. Hay gran cantidad de diterpenos representados por neo y entclerodanos<sup>21</sup>.

También se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Baccharis salicifolia*, encontrándose moderada actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas (CMI = 0,47 y 0,94 µg/mL), siguiendo el método sugerido por CLSI. El aceite esencial tuvo la más alta actividad contra *Bacillus cereus*. Todas las bacterias gram negativas utilizadas en el estudio fueron resistentes<sup>20</sup>.

En otro estudio experimental hecho en Brasil (2013), se estudiaron los efectos del aceite esencial de *Baccharis coridifolia* en la actividad de antibióticos. Se realizaron los ensayos con ampicilina, cefalotin, cloranfenicol, gentamicina y tetraciclina en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. A los discos se les impregnó primero los antibióticos y luego se añadió el aceite esencial extraído de la planta (obtenida de Paraná, Brasil). Se obtuvo como resultado una actividad sinérgica entre el aceite esencial y el cefalotin en ambas cepas, así como con la tetraciclina para *E. coli*; sin embargo, mostró actividad antagonista para ampicilina y cloranfenicol, e inhibición de la actividad de la gentamicina contra *S. aureus*, observándose también un efecto indiferente en los demás casos<sup>22</sup>.

Se realizó un estudio experimental en Chile (2008) del efecto antimicobiano de tres especies de *Baccharis* (*Baccharis microphylla*, *Baccharis petiolata* y *Baccharis santeliciis*) en extractos acuosos- etanólicos y cloroformicos. El resultado determinó mayor actividad frente a bacterias gram positivas que en gram negativas y ninguna actividad frente a *Candida albicans* y gram negativos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, no hubo significancia entre los resultados de ambos extractos<sup>23</sup>.

En un estudio descriptivo realizado en Perú (2015), se tuvieron como objetivos determinar el efecto genotóxico *in vitro* de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze frente a ADN genómicos de *Homo sapiens sapiens*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, e identificar sus metabolitos secundarios. Los resultados mostraron actividad genotóxica *in vitro* significativa sobre las 3 muestras de ADN genómico atribuido al extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Schkuhria pinnata* a concentraciones entre 5 - 100 mg/mL, manifestado por la fragmentación de ADN medido a dos longitudes de onda UV 260 nm y 280 nm atribuido a la presencia de metabolitos secundarios (flavonoides, alcaloides y taninos)<sup>24</sup>.

En otro estudio experimental hecho en Perú (2017) se tuvo como finalidad investigar la actividad antioxidante y aldosa reductasa inhibitoria de 24 plantas peruanas de té infusión. La actividad antioxidante reportada es alta para un extracto de *Schkuhria pinnata* en metanol 70% a una concentración de 5 mg/mL (% inhibición de  $69,15 \pm 4,27$  por DPPH y  $76,38 \pm 4,81$  por ABTS<sup>·+</sup>) y una actividad media del extracto de *Baccharis genistelloides* (% inhibición de  $40,0 \pm 9,2$  por DPPH y  $29,92 \pm 1,09$  por ABTS<sup>·+</sup>)<sup>25</sup>.

En un estudio comparativo de plantas hepatoprotectoras de origen chino y peruano hecho en Perú (2017), además de evaluar sus semejanzas y diferencias, también se investigaron sus metabolitos secundarios. Una de las plantas estudiadas fue *Schkuhria pinnata* (Lamarck.) K cuyo screening fitoquímico demostró la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, saponinas, derivados terpénicos y antraquinonas. Además, se realizó una cromatografía en capa fina al extracto empleando como sistema disolvente una mezcla de acetato de etilo y etanol (1:3) y los reactivos de Dragendorff y tricloruro férrico para identificar alcaloides y grupos fenólicos respectivamente<sup>26</sup>.

En un estudio experimental realizado en Perú (2007), se evaluó la actividad antihelmíntica de los extractos acuosos obtenidos por cocimiento de *Euphorbia huanchahana* y *Baccharis salicifolia* contra los oxiuros *Syphacia obvelata* y *Aspiculuris tetráptera*, además de determinar la naturaleza de los metabolitos secundarios por

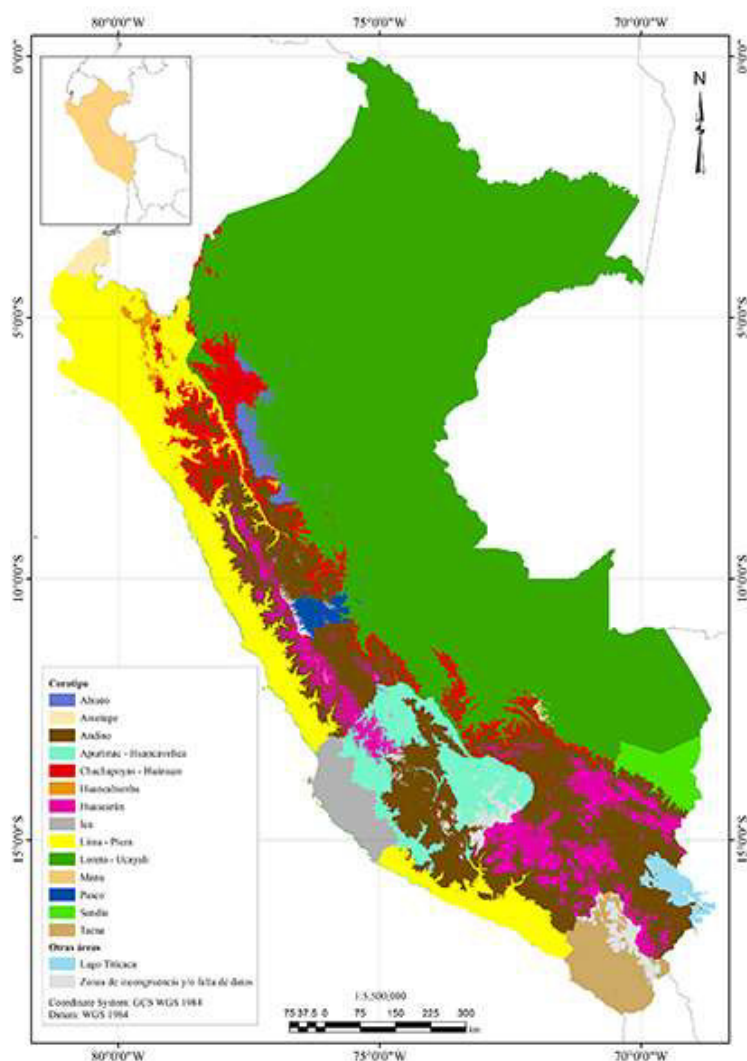
estudios fisicoquímicos, y los efectos tóxicos de los extractos. En el caso de la chilca, su porcentaje de eficacia aumenta con la concentración hacia la *Syphacia obvelata*, pero se mantiene para el otro oxiuro. Su parte aérea presenta alcaloides, flavonoides, esteroides, antraquinonas y cardiotónicos. Asimismo, no es tóxica<sup>27</sup>.

En un estudio experimental realizado en Perú (2017), se tuvo como objetivo identificar metabolitos secundarios de interés medicinal en las hojas de *Baccharis latifolia*. Siguiendo la marcha fitoquímica de *Baccharis latifolia*, se obtuvo como resultado la presencia de muchos compuestos fenólicos en los extractos etanólico, clorofórmico y acidulado (en este último se encontraron alcaloides), pero ninguno en el extracto de n-hexano, además de no presentar aminoácidos ni lípidos en los extractos mencionados<sup>28</sup>.

En un estudio descriptivo y experimental realizado en el departamento de Ayacucho, Perú (2015), se buscó hacerlo desde el punto de vista etnobotánico, químico y farmacológico de tres especies del género *Baccharis*, para el cual se recolectaron como muestras las hojas de dichas especies (entre las cuales estaba *Baccharis salicifolia*), trabajándose con extractos hidroalcohólicos. Respecto al estudio etnobotánico, la planta chilca se utiliza como antiinflamatorio, analgésico, cicatrizante, antirreumático, entre otros usos. El screening fitoquímico demostró la presencia de taninos, flavonoides, triterpenos, esteroides, catequinas, sustancias reductoras, lactonas, cumarinas y azúcares reductores. Los ensayos cromatográficos (para los cuales usaron como sistema cromatográfico cloroformo y metanol) confirmaron la presencia de flavonas y flavanonas (15 flavonas y siete flavanonas, además de 22 diterpenos, 17 labdanos, tres clerodanos y dos triterpenos). El ensayo de actividad antiinflamatoria confirma dicha propiedad, atribuyéndolo a los flavonoides y a los triterpenos. Además, la planta exhibió una gran actividad antioxidante debido a la alta presencia de flavonoides. Por último, no mostró actividad antimicrobiana a una concentración de 1% contra *Shigella sonnei*, *Salmonella sp* y *Staphylococcus aureus*<sup>29</sup>.

## 2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA ASTERACEAE

La familia *Asteraceae*, también denominada *Compositae* o asteráceas, comprenden más de 1700 géneros y unas 24000 a 30000 especies distribuidas alrededor del mundo, exceptuando la Antártida, de variadas características: herbáceas, suculentas, lianas, epifitas, árboles y arbustos. Evidencias filogenéticas y datos paleontológicos sugieren que el ancestro de *Asteraceae* surgió en la región andina de Sudamérica<sup>30</sup>.



**Figura 1.** Distribución de las especies de la familia *Asteraceae* en el Perú, mayor presencia en las zonas Chachapoyas-Huánuco (rojo) y Lima-Piura (amarillo)<sup>31</sup>.

Esta familia figura como la segunda con mayor riqueza en nuestro país, ya que abarca cerca del 10% de la flora total, de las cuales se han registrado 1669 taxones distribuidos en 255 géneros en Perú y de mayor abundancia en la zona desde Chachapoyas-Huánuco (comprende los departamentos Cusco, Junín, Huánuco, Cajamarca, La Libertad y Amazonas), seguida de Lima-Piura (Ancash, Arequipa, Lima, Cajamarca, Lambayeque, Piura). Las especies de esta familia pueden crecer en diferentes altitudes, de gran diversidad en zonas templadas y menor en bosques tropicales o subtropicales<sup>31,32</sup>.

En cuanto a morfología se refiere, pueden ser hierbas anuales o perennes, subarborescentes, arbustos, árboles o lianas, con o sin látex. Sus hojas pueden ser alternas, opuestas o verticiladas, enteras o dentadas. Las flores sésiles son agrupadas en un receptáculo común, rodeadas por el involucro conformado por filarias o brácteas formando en conjunto una inflorescencia denominada capítulo. El capítulo puede ser de cuatro tipos: radiado (dos tipos de flores muy diferentes), disciforme (dos tipos de flores parecidas), ligulado (un solo tipo de flor ligulada) y discoideo (un solo tipo de flor). El cáliz ausente es reemplazado por una estructura escamosa o pilosa denominada papus que ayuda a dispersar los frutos. La corola gamopétala es de tipo tubulosa, filiforme, bilabiada o ligulada. Las flores dispuestas en el margen del capítulo hacia afuera se denominan flores marginales y las localizadas hacia el centro son llamadas flores del disco. El androceo está formado por cinco estambres insertos en el tubo de la corola con filamentos libres entre sí; las anteras están unidas formando un tubo. El ovario es ínfero, bicarpelar y unilocular. El fruto es aquenio o cipsela, uniseminado; glabro o pubescente, liso o con costillas marcadas, truncado en la parte superior o a veces prolongado en un largo rostro<sup>32</sup>.

### **2.2.1. GÉNERO *SCHKUHRIA***

Lleva el nombre en honor a Christian Schkuhr (1741-1811), ilustrador y botánico alemán, partidario del sistema de Linneo, que se consagra al estudio de la flora de Wittenberg<sup>33</sup>.

Del genero *Schkuhria* son aceptadas solo siete especies, *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze ex Thell, *Schkuhria anthemoides* (Kunth) Wedd, *Schkuhria degenerica* (Kuntze) R.E.Fr, *Schkuhria multiflora* Hook. & Arn, *Schkuhria schkuhrioides* (Link & Otto) Thell, *Schkuhria sececioides* Nees y *Schkuhria virgata* (La Llave) DC. el resto de especies fueron transferidas al género *Bahia* Lag<sup>34</sup>.

Este género es propio de América, común en las zonas cálidas y tropicales, extendiéndose desde el suroccidente de Norteamérica hasta México y Guatemala y en Sudamérica, desde Venezuela y Colombia hasta Argentina y Chile. En Perú se encuentra distribuido desde Piura hasta Moquegua a una altura entre los 1000 y 3000 msnm<sup>32</sup>.

Las especies de *Schkuhria* tienen algún uso en medicina popular. De acuerdo con las etiquetas en muchos de los especímenes, las plantas se usan como repelentes de insectos o insecticidas, particularmente para matar pulgas. Una interesante observación de los especímenes de *Schkuhria* es que se hallan libres de daño por insectos<sup>41</sup>.

El género *Schkuhria* se caracteriza por biosintetizar generalmente lactonas sesquiterpénicas (eudesmanólidas, guayanólidas, germacranólidas)<sup>42</sup>.

#### **2.2.1.1. DESCRIPCIÓN**

Hierbas anuales, erguidas, ramificadas desde la base con hojas 1-3-pinnatisectas. Capítulos pequeños, solitarios o en cimas paucicéfalas, pedicelados. Receptáculo desnudo cubierto por 1-2 ciclos de brácteas formando un involucre cilíndrico o acampanado. Flores dimorfas, o bien isomorfas por ausencia de las marginales. Flores marginales pistiladas, brevemente liguladas, las centrales perfectas, tubulosas, pentadentadas. Anteras no sagitadas con apéndice conectival ovado o rómbico. Ramas estigmáticas cortas, truncadas y con un mechón de pelos apicales. Aquenios obpiramidales, tetrágonos, negros. Papus con 8-12 escamas aristadas o míticas<sup>35</sup>

**2.2.1.2. *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze ex Thell**

**2.2.1.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

**Reino** : Plantae

**División** : Magnoliophyta

**Clase** : Magnoliopsida

**Subclase** : Asteridae

**Orden** : Asterales

**Familia** : Asteraceae

**Género** : Schkuhria

**Especie** : *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze ex Thell

**Nombre común** : Canchalagua de castilla, anisillo, escoba de anisillo, azureta, jayakpichana, cachalawua, piqui-picchana<sup>7</sup>, canchalagua, pichana, matapulga<sup>8</sup> "canchalahua", "manzanilla silvestre", "yerba de la pulga", "mata pulgas", "matapulga" o matapulgas<sup>38</sup>.



**Figura 2.** Planta adulta de *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell (Fotografía tomada en el Distrito de Ambo, Huánuco).



#### 2.2.1.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

*Schkuhria pinnata* es una planta herbácea anual, de porte erecto, midiendo entre 20-50 cm de altura. Las hojas son alternas, de 10-40 cm de largo, pinatisectas o bipinatisectas con los segmentos lineal-filiformes de 0,5-1 mm de ancho. Los capítulos son largamente pedunculados, dimorfos, con 6 a 9 flores de las cuales una es pistilada con corola ligulada y el resto son flores hermafroditas o perfectas con corolas tubulosas. Los capítulos a su vez están agrupados en inflorescencias tipo racemosas compuestas de ramas cimoso-corimbosas laxas, con 5 filarias (brácteas) de margen membranáceo. El fruto es un aquenio, de 3 - 4 mm de largo, obpiramidal, con 4 ángulos y papus formado por 8 páleas ovadas, místicas o aristadas<sup>36</sup>.



**Figura 3.** Especie vegetal *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell. Fuente: Herbarium Field Museum<sup>39</sup>.

### 2.2.1.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Lactonas sesquiterpénicas (schkuhripinatólidos A, B y C, hiyodorilactonas A, B, y C, liliólido, schkuhrina I y II, zaluzanina C y 8- $\beta$ -(4'-hidroxitigloiloxi)-3-dihidroxi-4 $\beta$ ,15-dihidrozaluzanina C), eucannabinolida, heliangólidos, pectolarigenina, eucannabinólidos, los germacranólidos schkuhrina-I y schkuhrina-II, esteroides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, taraxasterol,  $\alpha$  y  $\beta$ -espinasterol), flavonoides (pectolarigenina, 5,7,3,4-tetrahidroxi-6-metoxiflavonol, 5,7,3,4-tetrahidroxi-3-metoxiflavona), compuestos azufrados, un lignano (schkuhrianol) derivados terpénicos (helangiólido), y 11,13-dihidroeriolina<sup>40</sup>.

### 2.2.1.2.4. USOS Y PROPIEDADES

*Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze ex Thell posee una gran variedad de usos y efectos medicinales, se emplea generalmente las hojas o toda la planta y en menor medida la raíz. Entre sus propiedades se emplea como depurativo de la sangre, antibiótico, antiinflamatorio, contra problemas digestivos, contra la tos, diurética, antidiabética, para tratar problemas del hígado y los riñones, contra la malaria, alergias, venas varicosas, contra infecciones por hongos (levaduras), obesidad, inflamación de la próstata, flatulencia (gas), diarrea, reumatismo, problemas de la piel (acné, dermatitis y eczema). En infusión se toma para regular trastornos menstruales, contra infecciones urinarias, dolor de los riñones y antiespasmódica. Externamente, la decocción de la planta se aplica a la piel como antiséptico para curar heridas. En varios países latinoamericanos, la planta se seca y pulveriza para uso doméstico como insecticida y repelente de insectos, especialmente contra pulgas y piojos<sup>40</sup>.

## 2.2.2. GÉNERO *BACCHARIS*

### 2.2.2.1. DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES

El género *Baccharis* es el más numeroso de la familia *Asteraceae*<sup>43-45</sup>. Si bien aún no se encuentra monografiado este género (esto es, no se sabe con exactitud cuántas especies lo conforman)<sup>17, 43</sup>, diversos autores han propuesto diferentes cifras, situando algunos el número entre 338 y 400<sup>16, 46</sup>, 400 a 500<sup>43-45</sup>, e incluso más de 500 especies<sup>47, 48</sup>. Su distribución es restringida al continente americano: va desde el sur de los Estados Unidos hasta el extremo sur de Argentina y Chile<sup>21, 43</sup>. Dado que en

Brasil y los Andes hay una alta concentración de especies de este género, se postula que probablemente una de estas áreas sea el centro de origen. Así, tenemos que en Brasil existen 120 especies (mayormente ubicados en la región sureste); en Argentina, unas 100 especies; en México, 28; en Colombia, 40; en Ecuador y Uruguay, unas 35; en Perú, 70, etc.<sup>23, 29, 43, 44, 49</sup>.

Las especies de este género son en general arbustos con una altura entre 0,5 a 4 metros. Se caracterizan por tener indumento en tallos y hojas, con tricomas fusionados que tienen solo una célula basal adyacente, y por la ocurrencia de plantas dioicas<sup>46, 47, 49</sup>. Tienen hojas en su inmensa mayoría alternas y morfológicamente diferentes, lo que ayuda a la identificación. Los capítulos son pequeños y ordenados en inflorescencias compuestas o pseudoinflorescencias, frecuentemente del tipo mimoso, pueden presentar flores blancas, cremas o rosadas. Las flores femeninas poseen una corola filiforme y ápice denticulado; por otro lado, las flores masculinas poseen una corola tubulosa, limbo ensanchado y pentasecto<sup>17, 50</sup>.

Si bien tiene diversos caracteres fácilmente reconocibles en las partes vegetativas (con especial énfasis en la forma de las hojas, mencionado líneas arriba) y en los arreglos de los capítulos, la aparente homogeneidad morfológica y el reducido tamaño de los capítulos han hecho problemática la delimitación entre especies<sup>49</sup>. Así, tenemos que la clasificación infragenérica del género *Baccharis* ha variado con el paso del tiempo, remontándonos a 1807, cuando Persoon agrupó bajo el nombre de Molina (Ruiz & Pav.) Pers. un grupo de especies de *Baccharis* sin emplear algún criterio de uniformidad (aparentemente). Unas décadas después, en 1836, De Candolle se convierte en el primero que estableció una clasificación a nivel infragenérico de *Baccharis*, subdividiéndole en 8 secciones según la morfología de las hojas. Autores diversos posteriores a él utilizaron su sistema propuesto para ubicar a las especies estudiadas por ellos. Del mismo modo, otros autores se han basado en el modelo de De Candolle para agrupar en secciones a las especies en estudio de sus países. Aparte de agruparlas, también han propuesto diferentes modelos en los que amplían o reducen el número de secciones existentes. Cabe mencionar como ejemplo el

modelo propuesto por Giuliano en el 2001, en el que divide las 96 especies argentinas del género *Baccharis* en 15 secciones, de las cuales una es propuesta por él<sup>43, 52</sup>.

Entre los muchos usos de la medicina tradicional de las especies de *Baccharis*, tenemos que incluye el tratamiento de heridas, fiebre, enfermedades gastrointestinales (se usan como espasmolíticos, diuréticos y analgésicos), para el tratamiento de diabetes, anemias, inflamaciones urinarias, amigdalitis, dolencias de la próstata e infecciones bacterianas y fúngicas, como desintoxicante del organismo, entre otros males diversos<sup>17, 21, 51</sup>. El emplastado hecho con hojas se aplica sobre miembros luxados o fracturados para reducir la inflamación. La infusión de las hojas ayuda a aliviar los padecimientos del parto y posparto. Se emplean también en baños para tratar problemas reumáticos, inflamaciones externas y golpes. Asimismo, se consumen como infusión para tratar enfermedades del estómago, del hígado, entre otras mencionadas anteriormente<sup>21, 44, 47</sup>.

Las propiedades medicinales atribuidas a las especies del género *Baccharis* se deben a su composición química, la cual se basa principalmente en flavonoides, diterpenos y triterpenos. De los flavonoides, están en mayor concentración las flavonas (cerca de la mitad son C-3 oxigenadas) y los flavonoles (predominando las flavonas), en tanto que de los diterpenos tenemos a los clerodanos, los labdanos, y a los kauranos, predominando los primeros. En este género, los flavonoides se presentan como agliconas libres y muy raramente en la forma glicosilada, y confieren resistencia frente al ataque de microorganismos. Además, las especies del género *Baccharis* también tienen otros compuestos en su composición química, como compuestos fenólicos, cumarinas (de las que hay muy pocos reportes) y aceites esenciales (de los que se han identificado más de 100 constituyentes)<sup>17, 19, 45, 47, 50</sup>.

#### **2.2.2.2. *Baccharis latifolia* (R&P) Pers.**

##### **2.2.2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

**Reino** : Plantae

**Phylum** : Magnoliophyta

**Clase** : Magnoliopsida

**Subclase** : Asteridae

**Orden** : Asterales

**Familia** : Asteraceae

**Género** : Baccharis

**Especie** : *Baccharis latifolia* (R & P) Pers.

**Nombre común** : Chilca



**Figura 4.** Especie vegetal *Baccharis latifolia* (R & P) Pers. Fuente: Herbarium Field Museum<sup>39</sup>.

#### 2.2.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Esta especie se distribuye por toda la zona tropiandina, desde Venezuela hasta Bolivia y el norte de Argentina. Su rango altitudinal es de 1600 a 3800 m.s.n.m. Predominan entre los 2500-3000 m.s.n.m. No obstante, también se puede establecer a un rango de 500-1100 m.s.n.m. Se desarrolla en zonas con temperatura promedio de 7-19 °C. Dado que presenta alta tolerancia a suelos pobres y difíciles debido a su rusticidad, crece en suelos deteriorados con algo de materia orgánica y humedad, en lugares con pedregosidad y carentes de agua, en suelos con moderado grado de desarrollo que contengan pedregones, arcilla, grava y arena con moderada a baja fertilidad, y se adapta a cualquier textura. Al contar con una elevada capacidad de reproducción por semilla, puede proliferar con facilidad<sup>17, 21, 45, 50</sup>.

La especie *Baccharis latifolia* (R & P) Pers. es un arbusto de abundante follaje cuya altura oscila entre 1,5 y 3 metros. Presenta hojas simples alternas, con peciolo de 1,5 a 2 centímetros de largo, dentadas, oblongo-lanceoladas, de ápice acuminado, base decidua o atenuada, uniformemente aserrada en el margen, de 6 a 12 centímetros de largo y 2 a 3,5 centímetros de ancho, de color verde brillante por el haz, pegajosas, y con 3 nervios pronunciados que salen desde la base. Sus ramas son delgadas, glabras y resinosas. Su tallo es cilíndrico y estriado longitudinalmente, de color café, gruesamente enramado, y rebrota fácilmente formando una copa densa. La inflorescencia es blanquecina paniculada, terminal y ramificada, los capítulos son numerosos, pedunculados en panículas corimbosas terminales y se disponen en los ápices de las ramas (mientras que los capítulos masculinos cuentan con 15-45 flores pseudohermafroditas con corolas tubulares de 3-6 milímetros de largo igual que los estambres y antenas apicales, los capítulos femeninos tienen 100-150 flores hermafroditas o solo femeninas, con la corola apicalmente truncada con más de una serie de pelos, y el estilo es de 3-5 milímetros de largo). Su umbrela o involucreo es acampanado, las brácteas en 3 o más hileras o series de borde transparente (las brácteas externas son oblongas y redondas en el ápice, mientras que las internas son oblongo-lanceoladas, además de tener el receptáculo convexo). Los frutos son glabros, del tipo aquenios de color café, de 4-5 milímetros de longitud, con papo o

vilano en las flores femeninas de color pajizo que está formado por aristas largas y abundantes, reducidos en grupos vellosos muy pequeños. Su propagación es por semillas, que son diminutas, las cuales se recogen cuando el vilano está bien desarrollado y los frutos se desprenden fácilmente de los capítulos<sup>17, 21, 23,45, 50, 53, 54</sup>.

#### **2.2.2.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA**

En líneas generales, los diferentes estudios realizados han reportado compuestos tales como compuestos fenólicos, alcaloides y compuestos terpénicos y/o esteroidales. Por ejemplo, en el caso de los compuestos fenólicos, tenemos a las cumarinas y a los flavonoides, los cuales serían los responsables de la actividad antiinflamatoria de la planta. Entre los flavonoides, podemos encontrar que se han aislado compuestos tales como quercitina, trimetoxiluteolina, hispidulina, apigelina, rhamnazin, entre otros, siendo los principales y mayoritarios la luteolina y la acacetina<sup>21, 54, 56</sup>.

Luego, entre los compuestos terpénicos y/o esteroidales, están los monoterpenos ( $\alpha$ -felandreno, canfeno, componentes del aceite esencial como carquejol, sabineno,  $\beta$ -felandreno, mayormente limoneno, etc.), diterpenos (clerodanos, labdanos) y los sesquiterpenos ( $\gamma$ -gurjunena, escualeno, eudesmano, componentes del aceite esencial como  $\alpha$ -tijueno,  $\alpha$ -cadineno, germacreno D, etc.). Estos componentes fueron aislados de las partes aéreas de la planta y de su raíz<sup>17, 21,45, 54, 58</sup>.

En adición a lo anterior, diversos estudios han reportado la existencia de otros compuestos como galotaninos, trementina, oxidasas, resina, entre otros<sup>57</sup>.

#### **2.2.2.2.4. USOS Y PROPIEDADES**

La chilca tiene múltiples usos en la medicina tradicional. Así, tenemos que sus hojas se pueden aplicar directamente sobre las heridas o afecciones de la piel, dando un mejor resultado si se les aplica calientes en las áreas reumáticas. Aplicadas en forma de cataplasma calma los dolores reumáticos y de la cintura (son eficaces para desinflamar y fortificar las áreas afectadas), es también preconizada en afecciones bronquiales y pulmonares. Su emplasto se utiliza como analgésico y antiinflamatorio en ojos y cabeza. La infusión de las hojas se usa para calmar diarreas. Las hojas y

flores frescas o secas en decocción se administran oralmente para calmar la tos y la bronquitis. La cocción de hojas, tallos e inflorescencias es un tónico antidiabético y para enfermedades hepáticas. La infusión de las ramas se emplea como antiinflamatoria, antineurótica, antitumoral, antidisentérica, y para tratar enfermedades del hígado. La chilca se usa en cocimiento para desinflamar las articulaciones y adormecer los nervios y tendones. Su infusión se considera una bebida inmejorable contra el asma, dolores menstruales y afecciones uterinas<sup>17, 23, 45, 50, 54, 55</sup>.

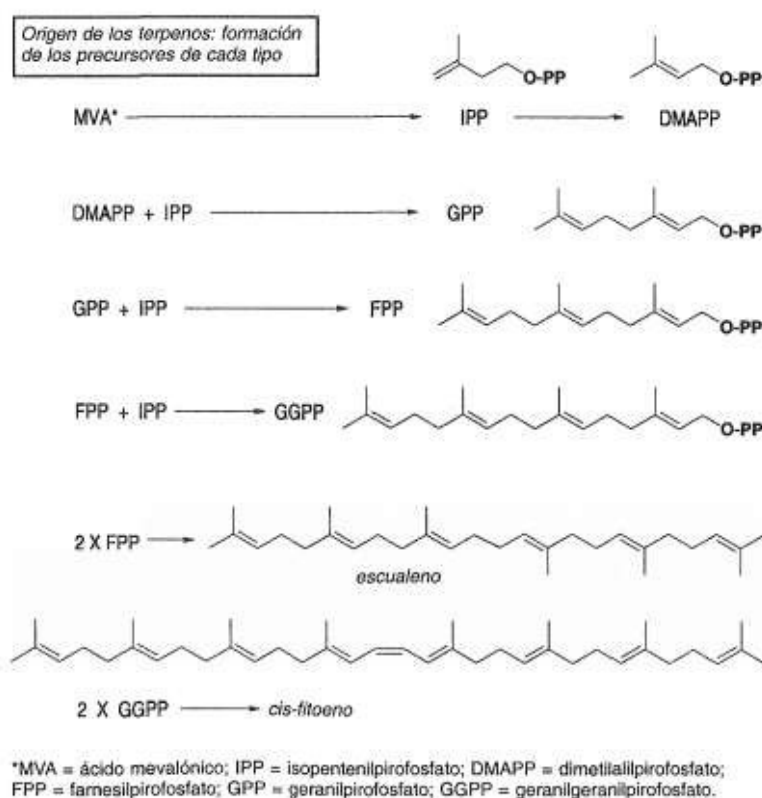
Por otro lado, aparte de lo usos medicinales descritos líneas arriba, tenemos que también tiene otros usos. Así, como uso industrial, la chilca se utiliza para preparar de forma artesanal tintes de color amarillo o verde. Aparte, tiene uso agroforestal, en donde tenemos que se utiliza para proteger y conservar los suelos, dado que no genera competencia con otras plantas y cultivos al tener un sistema radicular denso y no largo. Aparte, ayuda a la recuperación de los suelos por el sobrepastoreo, y su tallo se puede usar como leña porque contiene sustancias resinosas<sup>17, 45, 50</sup>.

## **2.3. TERPENOS**

Los terpenos vienen a ser el grupo más numeroso de metabolitos secundarios en las especies vegetales. También conocidos como isoprenoides, derivan de la condensación “cabeza-cola” de unidades de isopreno (un hidrocarburo de 5 átomos de carbono). Su biosíntesis se da principalmente con la ruta del ácido mevalónico (se da en el citosol, empezando con la condensación de 2 moléculas de acetil CoA, reacción catalizada por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa), a partir de la cual se obtienen 2 productos (que son los isoprenos básicos): isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). El DMAPP forma parte de los ésteres pirofosfóricos de alcoholes en  $(C_5)_n$ , los cuales son los precursores de los principales tipos de terpenos, los cuales se forman por adición secuencial de una unidad de IPP en el  $C_5$  de una molécula estárter (el primer término de la serie es el DMAPP). En el caso de los triterpenos y los esteroides, provienen del escualeno y del fitoeno. Aparte de la ruta de biosíntesis expuesta, se ha descubierto en los últimos años otra, que opera en ciertos organismos de origen bacteriano y vegetal: la ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato o ruta de la 5-Fosfono-1-Desoxi-D-Xilulosa (DXP). Esta es



independiente de la ruta del ácido mevalónico y se realiza en los plastidios. Esta ruta empieza con la condensación del ácido pirúvico con el gliceraldehído-3-fosfato mediante la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), dando al final como productos al IPP y su isómero DMAPP<sup>58-62</sup>.



**Figura 5.** Origen y síntesis de los terpenos y sus precursores<sup>58</sup>.

Se calcula un aproximado de 30 000 o más estructuras pertenecientes a esta familia de metabolitos secundarios, dado que no son necesarios para las funciones vitales de la célula. No obstante, cumplen muchas funciones en las plantas. Por ejemplo, tienen la capacidad de protegerlas contra herbívoros y patógenos, además de cumplir un papel en la atracción de polinizadores y animales que dispersan sus semillas. Se les atribuye responsabilidad en el aroma de las plantas debido a que componen en su mayoría los aceites esenciales (algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas), encontrándose mayormente monoterpenos como el limoneno y el mentol. Asimismo, en las resinas se pueden encontrar monoterpenos como el

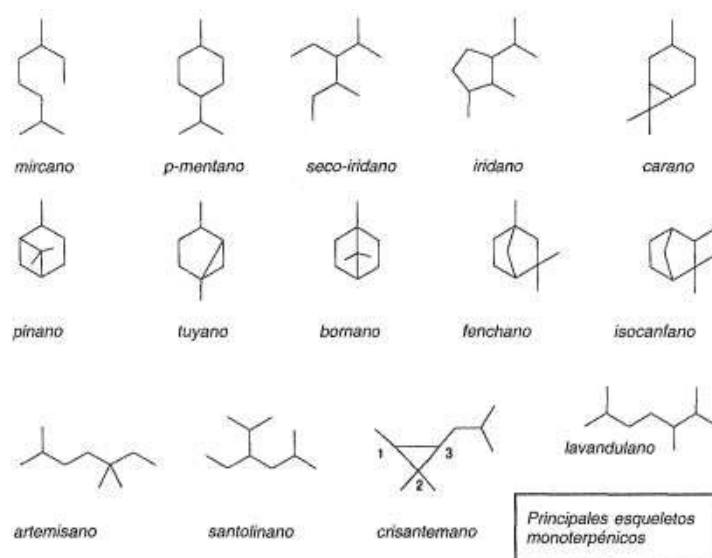
pineno que pueden actuar como insecticidas. Cabe mencionar que a algunos terpenos se les atribuyen propiedades variadas como anticancerígenos, antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, entre otras. Aparte, los terpenos tienen otros usos, como en la industria de agroquímicos, farmacéutica (principios activos y saborizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes), cosmética (perfumes y aromatizantes), entre otros<sup>60-64</sup>.

En 1887, el químico alemán Otto Wallach (Premio Nobel de Química en 1910) determinó la estructura de algunos terpenos de forma hipotética, en base a lo cual consideró que los terpenos debían estar formados a partir de unidades isoprenicas (una construcción repetitiva de estas). Unas tres décadas más tarde, Robinson (Premio Nobel de Química en 1947) perfecciona este concepto al proponer que las unidades de isopreno podían estar conectadas por sus extremos en una configuración cabeza cola. Ya en 1953, Ruzicka (Premio Nobel de Química en 1939), tras varios años estudiando a los terpenos, convierte la hipótesis de Wallach en un principio (el cual fue comprobado después de forma experimental): cada grupo de terpenos es el resultado de la condensación “cabeza-cola” de un número variable de unidades isoprenicas. Este vino a ser la regla biogenética del isopreno. Dicho de otra forma, a partir de un precursor se producen los diferentes constituyentes conocidos por una sucesión de reacciones clásicas como ciclaciones, funcionalizaciones y reagrupamientos. Cabe resaltar que solo en algunos casos (monoterpenos irregulares como el ácido pirétrico) la regla no parece ser respetada, dado que se originan por acoplamiento de dos DMAPP. De esta forma, habiéndose comprobado que el isopreno era la unidad estructural, se tuvo en cuenta la cantidad de estas para su clasificación: hemiterpenos (1 unidad de isopreno), monoterpreno (2 unidades de isopreno), sesquiterpenos (3 unidades de isopreno), diterpenos (4 unidades de isopreno), triterpenos (6 unidades de isopreno), etc<sup>58, 59, 64, 65</sup>.

### **2.3.1. MONOTERPENOS**

Terpenos caracterizados por tener 2 unidades de isopreno (10 átomos de carbono). Su precursor, el geranil pirofosfato (GPP), se forma por condensación de una unidad de IPP y su isómero DMAPP, una reacción catalizada por una preniltransferasa: la

GPP-sintetasa. Los monoterpenos pueden tener una estructura regular, irregular o de iridoides. En el caso de los monoterpenos regulares, a partir del GPP se forman alcoholes e hidrocarburos acíclicos, mientras que los monoterpenos cíclicos se forman tras una serie de reacciones en las que participan las monoterpeno ciclasas (actúan según un mecanismo de isomerización-ciclación) que dan lugar al catión intermediario  $\alpha$ -terpinilo, aunque también pueden catalizar la formación de hidrocarburos. Este catión puede conducir, mediante ciclaciones y reagrupamientos, a los principales esqueletos monoterpénicos, formándose hidrocarburos o alcoholes. Por otro lado, tenemos a los monoterpenos irregulares, los cuales se originan a partir del pirofosfato de crisantemilo, el cual proviene del acoplamiento de dos moléculas de DMAPP (mencionado líneas arriba). Finalmente, en el caso de los iridoides, se han sugerido diversos procesos. Un ejemplo es la formación del iridodial a partir de la ciclación del 10-oxo-geranial, el cual por glucosilación y oxidación producen el loganósido, un precursor de la mayoría de los iridoides<sup>58, 67</sup>.



**Figura 6.** Principales esqueletos monoterpénicos<sup>58</sup>.

Ahondando un poco en los monoterpenos regulares, tenemos que pueden clasificarse en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. En los acíclicos, su estructura fundamental corresponde al 2,6-dimetiloctano, encontrándose en forma de hidrocarburos (mirceno), aldehídos (citrál) y alcoholes (geraniol). Luego, tenemos a los

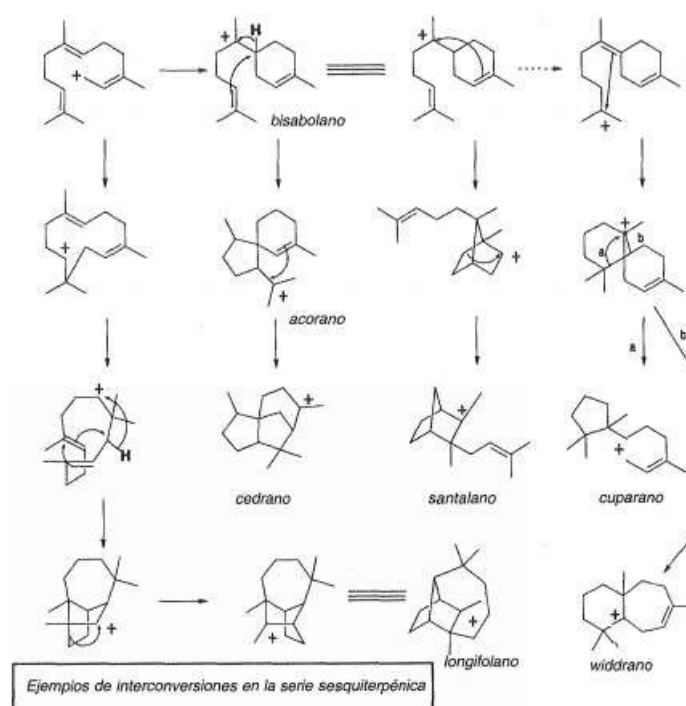
monocíclicos, entre los que podemos encontrar a hidrocarburos como el mentano,  $\alpha$ -terpineno (en la esencia de cedro y diversas coníferas), limoneno (compone más del 90% del aceite esencial de naranja); alcoholes como el mentol (abunda en la esencia de *Menta piperita*); o cetonas como la pulegona (presente en el poleo, por reducción da mentol). Después, tenemos a los bicíclicos, los cuales están conformados por dos anillos unidos directamente en la posición orto y tienen más de dos átomos de carbono en común entre ambos anillos. Según la forma como se une el segundo anillo al anillo de ciclohexano, se puede dividir en cuatro grupos: tuyano o sabinano, carano, pinano ( $\alpha$  y  $\beta$  pineno), y canfano o bornano (alcanfor, borneol, isoborneol). Por otro lado, como ejemplos de monoterpenos irregulares, tenemos al cafeno, santolina trieno y artemisia alcohol<sup>64, 67, 68</sup>.

Los monoterpenos se presentan por lo general en forma de líquidos volátiles, aunque en algunos casos se presentan como sólidos. Tienen un punto de ebullición entre 140° C y 180° C. Son abundantes en los aceites esenciales junto con sesquiterpenos, alcoholes simples, etc. Estos forman parte de la mayoría de monoterpenos que se encuentran en forma libre, aunque se vienen encontrando estructuras heterosídicas (habituales en los iridoides). Se encuentran de forma excepcional en el reino animal (en algunos insectos, como un coleóptero de la familia Silphidae que excreta por su glándula anal un compuesto monoterpénico para repeler a posibles competidores y depredadores), están en hongos y plantas no vasculares (en las algas están en forma halogenada), pero donde están ampliamente distribuidos es en los vegetales superiores. Algunos compuestos atraen polinizadores debido a sus olores, mientras que otros son disuasores alimentarios debido a su sabor amargo. Muchos poseen actividad antimicrobiana o son citotóxicos para ciertas plantas ( $\alpha$  y  $\beta$  pineno, limoneno), en tanto que otros poseen actividad alelopática (alcanfor, mentofurano). Así, los monoterpenos tienen muchos usos en perfumería, industria alimentaria (saborizantes) y farmacéutica<sup>55, 58, 64, 67, 68</sup>.

### 2.3.2. SESQUITERPENOS

Terpenos caracterizados por tener 3 unidades de isopreno (15 átomos de carbono). Si bien la mayoría presenta unión regular “cabeza-cola”, algunos son el resultado de

transposiciones en esta estructura. Su precursor común es el pirofosfato de farnesilo (FPP), el cual resulta de la adición de una molécula de IPP sobre el GPP. Así como en los monoterpenos, las ciclaciones intramoleculares adicionales, reagrupamientos y oxidaciones producen un gran número de estructuras. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Así como los monoterpenos, conforman los aceites esenciales. Su número no ha dejado de aumentar desde el aislamiento del cadineno y del cariofileno por Wallach a finales del siglo XIX y las primeras descripciones estructurales de estos terpenos. Se pueden clasificar en acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (bisaboleno, germacreno D), bicíclicos (cadineno, cariofileno), tricíclicos ( $\alpha$ -santaleno, aromadendreno) y tetracíclicos (iswareno)<sup>55, 58, 66</sup>.



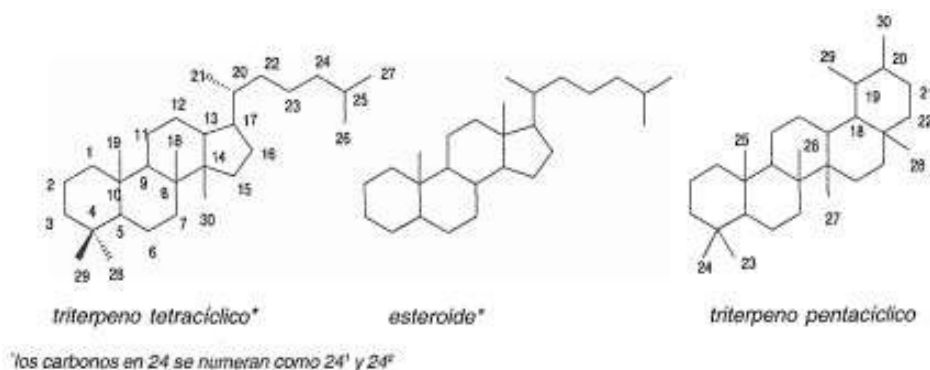
**Figura 7.** Reacciones de interconversión del catión bisabolilo para la obtención de esqueletos principales sesquiterpénicos<sup>58</sup>.

Muchas estructuras sesquiterpénicas son fitoalexinas, otras parecen ser reguladores del crecimiento, y otras atraen a los insectos o actúan en contra de estos. Como ejemplo de esto último tenemos al sesquiterpeno nootkatona, presente en una fruta originaria de Japón. Varias micotoxinas son de naturaleza sesquiterpénica. Del mismo modo, se han reportado efectos tóxicos de sesquiterpenos contra *Senecio palmensis*,

plaga que ataca las papas. Si bien se atribuye a los sesquiterpenos funciones como hormonas vegetales y como antibióticos de origen fúngico, pueden actuar como alelopáticos. Su producción y acumulación en cantidades considerables se relaciona con la presencia de estructuras secretoras especializadas. Como ejemplo de sesquiterpenos en plantas tenemos al capsidiol, cuya acumulación limita la dispersión de patógenos en tejidos infectados. Al ser un metabolito inestable, sus niveles decaen tras su síntesis. Un pigmento presente mayoritariamente en los algodones es el ( $\pm$ )-gospol, el cual al combinarse con las aminas distales de las lisinas proteicas disminuye el valor nutricional de las tortas de algodón. Al administrarse a diversas especies animales, en el macho induce una oligospermia, mientras que en la hembra induce un efecto antianidatorio (esto se debe a su isómero (-)). Sus manifestaciones tóxicas son por el isómero (+). Dado que es termolábil, pierde su toxicidad al tratarse con altas temperaturas durante el proceso de extracción del aceite<sup>58, 63, 66, 67, 68</sup>.

### **2.3.3. TRITERPENOS Y ESTEROIDES**

Terpenos caracterizados por tener 6 unidades de isopreno (30 átomos de carbono). Proceden de la ciclación del 3S-2,3-epóxido-2,3-dihidroescualeno, o más raramente del mismo escualeno (el cual se forma por reacción de 2 moléculas de FPP, precursor de los sesquiterpenos). Tienen una estructura cíclica compleja y son generalmente difíciles de caracterizar por su falta de reactividad química. Los triterpenos están presentes de forma habitual en plantas y animales superiores, hongos y bacterias. Tanto los triterpenos como los esteroides tienen una gran unidad estructural. La biosíntesis de estos compuestos comienza con la ciclación, la cual a su vez empieza con la apertura del epóxido (mencionado líneas arriba). La conformación inicial del epoxiescualeno (antes de la ciclación) orientará la biosíntesis por una parte hacia los esteroides y por otra hacia los triterpenos. En animales y hongos el primer esteroide sintetizado es el lanosterol, mientras que en los vegetales es el cicloartenol. En la mayoría de los animales, el lanosterol se transforma en colesterol, mientras que en los hongos se transforma en ergosterol. Luego, a través de una serie de reacciones, se forman los diversos compuestos pertenecientes a los esteroides<sup>58, 68</sup>.



**Figura 8.** Estructuras básicas de triterpenos y esteroides<sup>58</sup>.

Muchas plantas medicinales se usan para tratar enfermedades en las que el sistema inmune está implicado, lo cual se debe a los mecanismos de acción y efectos farmacológicos de los principios activos contenidos en ellas (de los que un gran grupo son triterpenos). Se les describe como agentes antivirales, antimicrobianos, antiinflamatorios, antitumorales, antioxidantes, hepa y cardioprotectores, así como compuestos inmunomoduladores. Se asume que los esqueletos del oleanano, ursano y lupano (triterpenos pentacíclicos) son los más importantes (a los del tipo lupano naturales o semi-sintéticos se les atribuye actividad contra el VIH-1 en las células permisivas), aunque también hay otros compuestos de gran importancia. Por ejemplo, tenemos a los limonoides, en los cuales encontramos limonina, la cual presenta un gusto amargo como las cucurbitacinas (derivados del ácido oleanólico, presentan actividad anticancerígena mediante inducción a apoptosis de células cancerígenas) y está presente en varios frutos de Citrus, y azadiractina (tiene una potente actividad antialimentaria para varios insectos, utilizándose como base para varios productos para control de plagas en cultivos). Tenemos también al lupeol, el cual ha sido extraído de un gran número de plantas, comprobándose que tiene actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora, antilipidémica y antioxidante<sup>68-71</sup>.

Los triterpenos más distribuidos y estudiados son los esteroides, que vienen a ser esteroides que contienen un grupo alcohol. La estructura de los esteroides se basa en el ciclopentanoperhidrofenantreno. En los animales, los esteroides se denominan zoosteroides. Como ejemplos de estos están el colesterol, componente mayoritario de

las membranas plasmáticas, el 7-dehidrocolesterol, que representa la vitamina D<sub>3</sub>, entre otros. En los hongos, se denominan micosteroides, como el ergosterol. En las plantas vienen a ser los fitosteroides, como el estigmasterol y el sitosterol (que forman parte de las membranas celulares y de organelos), espinasterol, etc. Los fitosteroides tienen como principal función formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y estabilidad, aunque algunos cumplen funciones protectoras frente a insectos, como la ecdisoma<sup>63, 68</sup>.

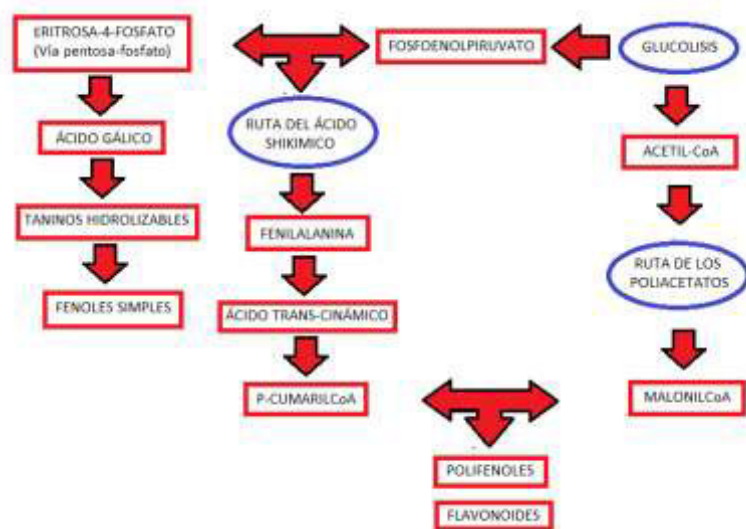
## **2.4. POLIFENOLES O FENOLES CARBOXILADOS**

Los polifenoles constituyen un grupo extenso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde las más simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados, todos con presencia de uno o más anillos fenólicos<sup>72</sup>.

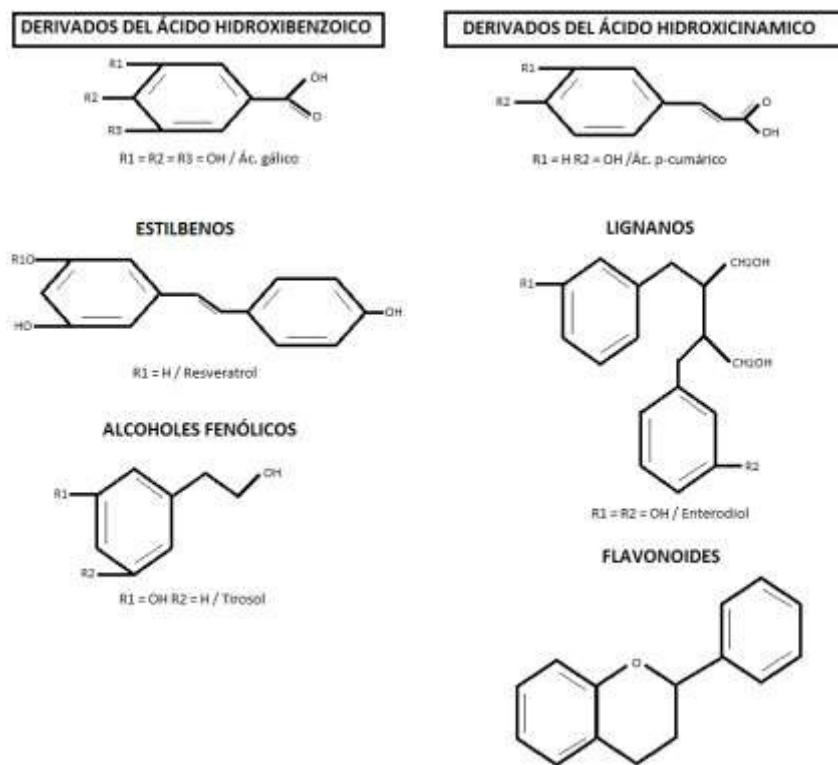
Son sintetizadas como producto del metabolismo secundario de las plantas a través de dos rutas principales: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos, en donde la primera proporciona aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina), ácido cinámico y sus derivados (fenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano); mientras que la segunda proporciona quinonas y xantonas. Estos metabolitos se sintetizan para sus funciones fisiológicas o defensa ante estímulos y situación de estrés<sup>73</sup>.

Los polifenoles se dividen en función al número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que estos presentan. Así, tenemos principalmente a los ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, alcoholes fenólicos, lignanos, fenilpropanoides y flavonoides<sup>73</sup>.





**Figura 9.** Ruta de la biosíntesis de los polifenoles<sup>73</sup>.

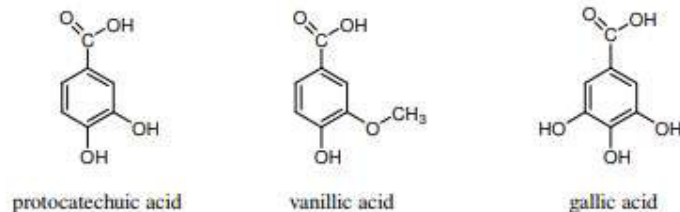


**Figura 10.** Principales estructuras de los grupos de polifenoles que derivan del núcleo principal<sup>74</sup>.

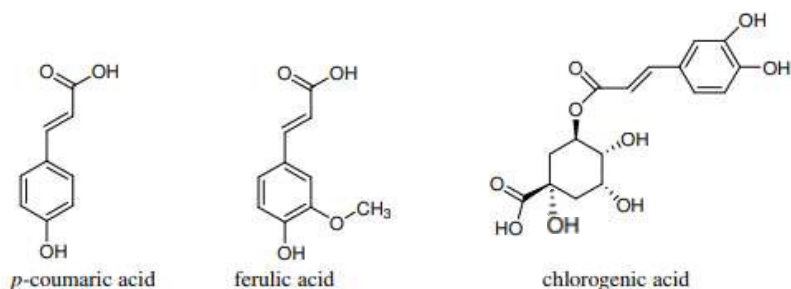
### 2.4.1. ÁCIDOS FENÓLICOS SIMPLES

Los ácidos fenólicos forman parte de los fenoles simples que poseen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, teniendo entre ellos a estructuras derivadas del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico. Cabe recalcar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos, esto conduce a que los derivados del ácido hidroxicinámico posean mayor actividad antioxidante que los derivados del ácido hidroxibenzoico<sup>74</sup>.

Mientras que los derivados del ácido hidroxibenzoico poseen un grupo carboxílico y grupos hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático, los derivados del ácido hidroxicinámico presentan un grupo  $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$  en remplazo del grupo carboxílico  $\text{COOH}$ ; el enlace doble carbono de su estructura aumenta la resonancia química, que puede ser descrita como una deslocalización de los electrones en los enlaces  $\pi$  que estabiliza los radicales libres e incrementa la capacidad antioxidante de la molécula<sup>74</sup>.



**Figura 11.** Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos<sup>74</sup>.



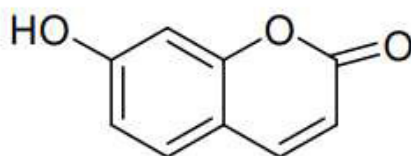
**Figura 12.** Estructura de los ácidos hidroxicinámicos<sup>74</sup>.

### 2.4.2. CUMARINAS

Su estructura contempla un anillo aromático unido a un heterociclo oxigenado, formando la estructura química “2H-1-benzopirán-2-ona”, originada por la

lactonización del ácido cumarínico. Las cumarinas se clasifican, según la genina, en hidroxycumarinas, metoxycumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas, pudiendo encontrarse en el vegetal en forma de heterósidos. En forma de heterósidos, es posible extraerlos en mezclas hidroalcohólicas y acuosas. Las cumarinas presentan amplia gama terapéutica, como venotónicos (esculetol), antiinflamatoria y antiespasmódica (piranocumarinas), anticoagulante (dicumarol), etc<sup>74, 75</sup>.

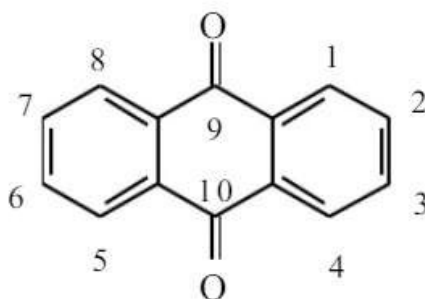
Por otro lado, se le ha atribuido propiedades antimicrobianas, un ejemplo de ello es la novobiocina, con actividad frente a bacterias gram positivas como *Staphylococcus aerus* resistente a meticilina<sup>75</sup>.



**Figura 13.** Estructura de una cumarina “2H-1-benzopirán-2-ona”<sup>74</sup>.

### 2.4.3. QUINONAS

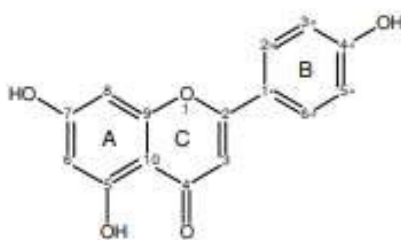
Las quinonas pertenecen a la clase de los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO). Se forman de la oxidación de compuestos aromáticos para dar la correspondiente dicetona. De acuerdo a su grado de complejidad química se clasifican en benzoquinonas (monocíclicas); naftoquinonas (bicíclicas) y antraquinonas (tricíclicas). Las quinonas se distribuyen ampliamente en hongos, plantas, bacterias y algunos animales. La importancia de las quinonas se debe a su amplia gama de actividad biológica ya que se han utilizado como agentes antimaláricos, antimicrobianos, antitumorales, fungicidas, anticancerígenos, debido a sus propiedades redox y son considerados como potentes antioxidantes. La propiedad redox se debe a su particular comportamiento oxidante y electrofílico<sup>74, 76, 77</sup>.



**Figura 14.** Estructura de una quinona<sup>74</sup>.

#### 2.4.4. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada (anillo pirano) a través de un oxígeno: un anillo dihidroxilados fenólicos en las posiciones 5 y 7, (anillo A), un segundo anillo fenólico generalmente mono-hidroxilado, orto-dihidroxilados o vic- trihidroxilados (anillo B), que también pueden contener grupos metoxi (O-CH<sub>3</sub>) como sustituyentes y el anillo C, que puede ser un anillo heterocíclicos con oxígeno pirano, pirylium o de forma pirona<sup>74, 78</sup>.

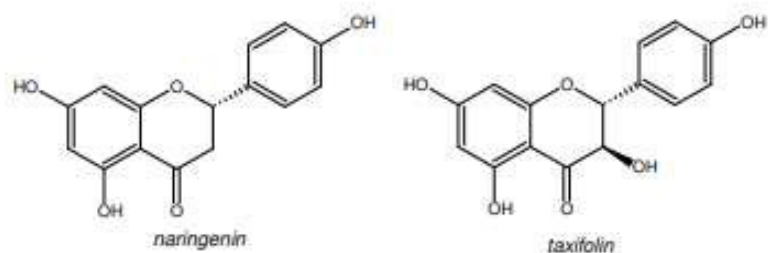


**Figura 15.** Estructura básica de un flavonoide<sup>74</sup>.

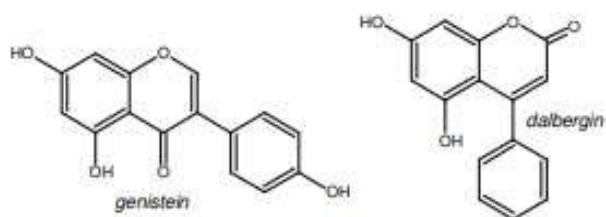
Gracias a las variaciones del anillo pirano y la posición de sustitución del anillo B es que se puede clasificar estructuralmente a los flavonoides. Dentro del grupo de los flavonoides propiamente dicho, los más destacables por su interés farmacológico son las flavonas, flavonoles, flavanonas y sus correspondientes heterósidos. Además, algunos isoflavonoides son importantes por su efecto estrogénico y el de los compuestos directamente relacionados con los flavonoides como las antocianidinas, las catequinas y las leucoantocianidinas<sup>79</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de los flavonoides con mayor importancia terapéutica.<sup>74</sup>

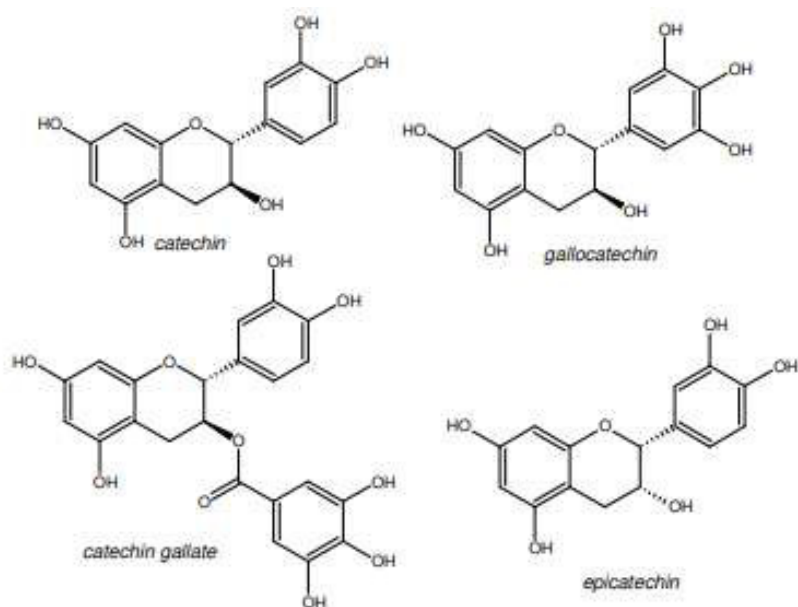
Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidina	Tienen un grupo –OH unido en posición 3 y posee un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.	Pelargonidina	
Flavanos	Posee un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	Catequina	
Flavonas	Posee un grupo carbonilo en posición 4 y carece del grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.	Diosmetina	
Flavonoles	Posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	



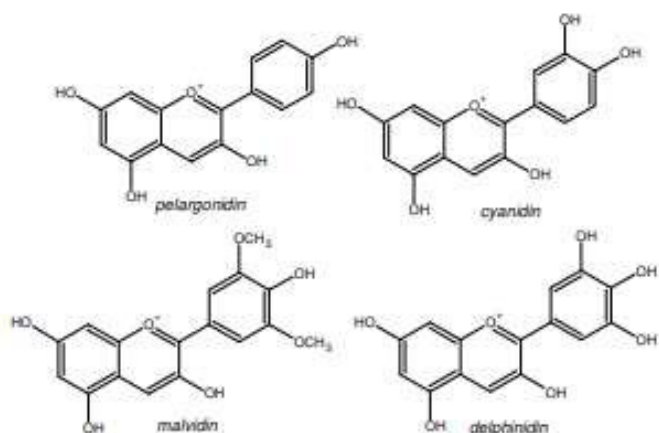
**Figura 16.** Estructura de las flavanonas y flavononoles<sup>74</sup>.



**Figura 17.** Estructura de las isoflavonas y neoflavonoides<sup>74</sup>.



**Figura 18.** Estructura de las catequinas<sup>74</sup>.

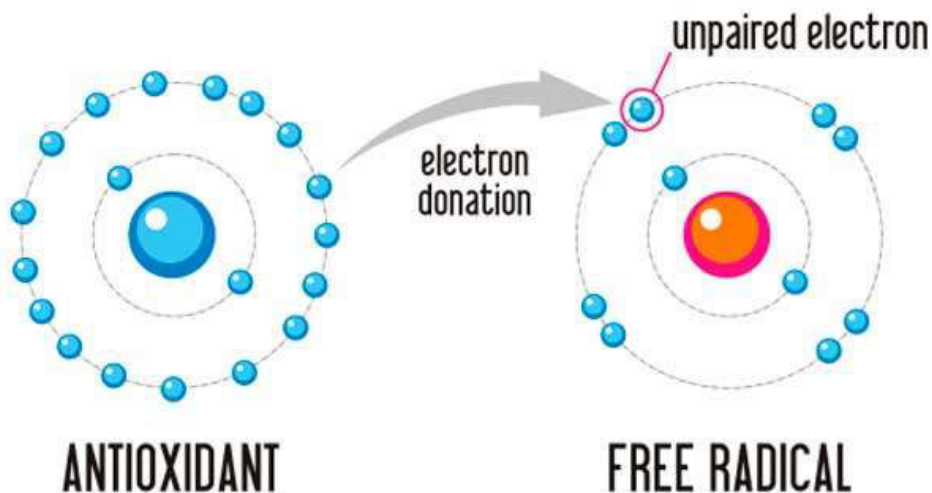


**Figura 19.** Estructura de las antocianidinas<sup>74</sup>.

La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres, quelar metales, además de la inhibición de las oxidasas (ciclooxigenasa, lipooxigenasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa); impidiendo la secuencia de formación de especies reactivas de oxígeno e hidroxiperoxidos al evitar las reacciones catalizadoras de los radicales libres; también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa<sup>78, 79</sup>.

## 2.5. ANTIOXIDANTES

Hacia fines de la década de los 90, Halliwell y Gutteridge definieron a los antioxidantes como sustancias que, hallándose a bajas concentraciones respecto de los sustratos oxidables (biomoléculas), tienen la capacidad de competir con ellos, inhibiendo o retardando significativamente su oxidación. Al reaccionar con el radical libre (especie química que contiene uno o más electrones no apareados por pérdida o ganancia de uno de ellos, lo que vuelve a la molécula más reactiva que su forma no radical), el antioxidante le cede un electrón, oxidándose y convirtiéndose en un radical libre débil, el cual presenta escasos o nulos efectos tóxicos. En otras palabras, estabilizan a los radicales libres mediante la inhibición de la peroxidación lipídica. Los antioxidantes presentan estructuras químicas y mecanismos de reacción muy variados, pueden actuar de forma individual en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener cada uno afinidad hacia uno o más radicales libres<sup>80-83</sup>.



**Figura 20.** Mecanismo de acción general de los antioxidantes frente a los radicales libres<sup>83</sup>.

Cabe mencionar aquí que existen otros términos que guardan relación con los antioxidantes. Por ejemplo, tenemos a los antioxidantes naturales, los cuales se presentan o se pueden extraer de tejidos de plantas o animales, así como los que se forman por cocción de compuestos alimenticios de origen animal o vegetal. Tienen una relación directa con la disminución de la incidencia de enfermedades coronarias y

cáncer. Como ejemplo tenemos a la vitamina E, vitamina C, glutatión peroxidasa,  $\beta$ -caroteno, entre otros. Continuando, encontramos a los antioxidantes dietéticos que hacen referencia a las sustancias que forman parte de los alimentos de consumo cotidiano y que pueden prevenir los efectos adversos de las especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales en los humanos<sup>81, 84, 85</sup>.

### **2.5.1. CLASIFICACIÓN**

Los antioxidantes se clasifican de diferentes formas. Por su modo de acción, tenemos a los antioxidantes primarios y secundarios. En el caso de los primarios, son aquellos antioxidantes que previenen la formación de radicales libres mediante interrupción de la reacción en cadena que los forman, evitando el estrés oxidativo. Por otro lado, están los antioxidantes secundarios, los cuales operan mediante diversos mecanismos tales como unión a metales pesados, captación del oxígeno, desactivación del oxígeno singulete, entre otros<sup>81, 84</sup>.

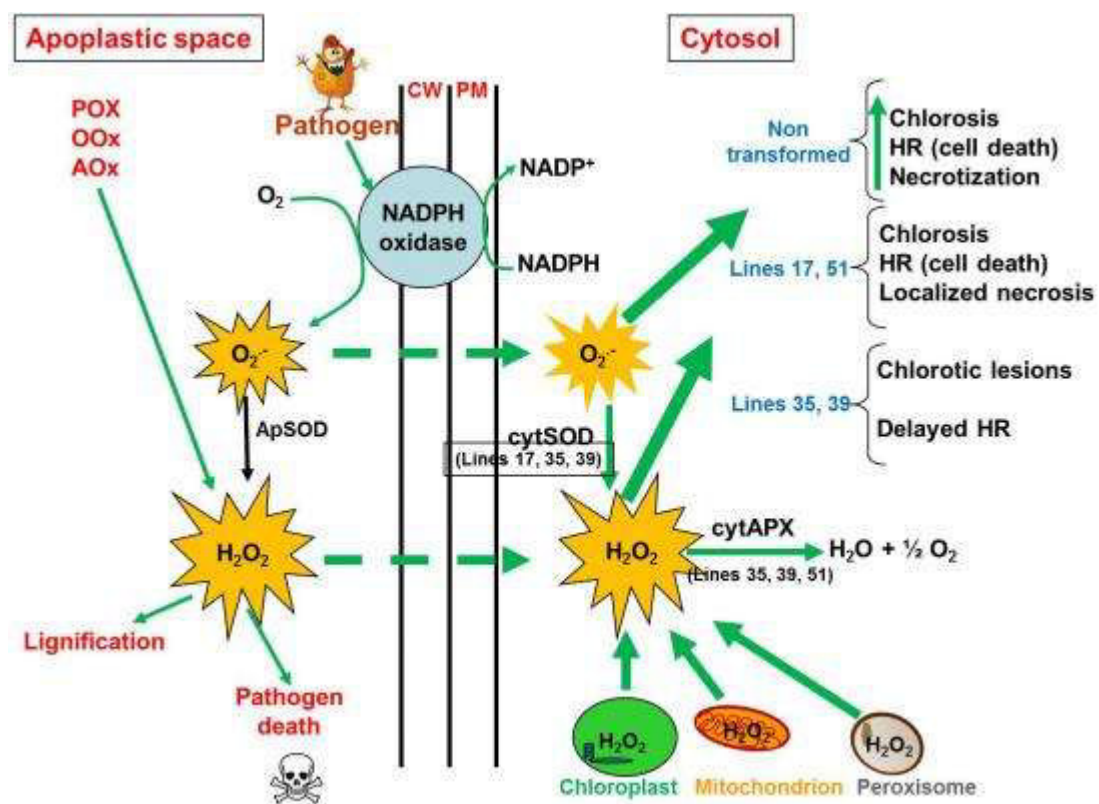
Además del modo de acción, los antioxidantes también se pueden clasificar en base a las diferencias según su estructura química y función biológica. Así, encontramos a los endógenos o enzimáticos, los cuales son sintetizados por la propia célula. Como ejemplos, encontramos a la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, entre otros. Por otro lado, tenemos a los exógenos o no enzimáticos, que vienen a ser los que ingresan al organismo mediante la dieta o suplementos con formulaciones antioxidantes. Ejemplos de estos antioxidantes: vitamina C, vitamina E, ubiquinona, polifenoles, betacaroteno, flavonoides, etc<sup>80, 82</sup>.

### **2.5.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo viene a ser el desequilibrio entre los sistemas oxidantes del organismo humano y los antioxidantes, causado por exceso de especies reactivas de oxígeno (EROS) en disminución o ausencia de los sistemas antioxidantes que las regulan. Como consecuencia, se produce daño celular por oxidación de ADN, enzimas, lípidos, entre otros compuestos, desencadenando una serie de reacciones que producirán más radicales libres, aumentando el daño celular. Las EROS se forman a partir del oxígeno molecular ( $O_2$ ), del cual una pequeña fracción (2%) se combina con



electrones presentes en la mitocondria (los que escapan de la cadena respiratoria), dando lugar a su reducción (para que se reduzca a agua necesita 4 electrones y 4 protones) y formación de dichas especies. También pueden tener origen exógeno (rayos X, humo de tabaco). Su participación en la célula es dual, dado que pueden ser beneficiosos (a bajas concentraciones forman parte de sus funciones fisiológicas, como la defensa contra agentes infecciosos) o perjudiciales (producen estrés oxidativo) en los sistemas vivos. Como ejemplos de EROS, tenemos el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), el cual resulta de la adición de un electrón al oxígeno molecular, el radical hidroxilo e ión hidroxilo ( $\cdot OH + OH^-$ ), los cuales se forman por disociación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en presencia de metales de transición (principalmente  $Fe^{+2}$ ) mediante la reacción de Fenton, entre otras<sup>80-82, 86, 87</sup>.



**Figura 21.** Estrés oxidativo<sup>88</sup>.

Frente a esto, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante (moléculas, enzimas y secuestrantes químicos). La primera línea de defensa viene a ser las enzimas, las cuales degradan las EROS a moléculas menos nocivas. Tenemos

a la superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), que descomponen al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oxígeno y agua, entre otras. Luego, las moléculas no enzimáticas forman la segunda línea de defensa, las cuales actúan sobre los radicales libres. Entre estas tenemos a los antioxidantes preventivos como las glicoproteínas y ceruloplasmina, los cuales secuestran a los iniciadores del proceso oxidativo (ejemplos: hierro y cobre), los antioxidantes secuestradores de EROS como el ácido úrico y la bilirrubina, que inhiben la cadena de reacción y propagación en la formación de radicales libres, y los antioxidantes nutricionales como las vitaminas A, E y C, los  $\beta$ -carotenos, compuestos fenólicos, ácido fólico,  $\alpha$ -tocoferol, entre otros, que cumplen diferentes funciones. Dado que no siempre nuestra defensa endógena antioxidante es completamente efectiva, se recomienda consumir una dieta rica en alimentos con antioxidantes naturales, como las frutas y verduras, para prevenir la formación de EROS<sup>80, 81, 84, 86, 87</sup>.

## **2.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Cuando hablamos de actividad antimicrobiana nos referimos a la capacidad de un producto o sustancia de impedir la proliferación de bacterias, hongos o parásitos causantes de diversas infecciones que pueden resultar en la muerte en los seres humanos. Por lo general, se determina mediante métodos de análisis microbiológicos; esto es, por medio del estudio del efecto inhibitorio frente a un microorganismo (que produce el halo de inhibición). En el caso de los antibióticos, pueden ser bacteriostáticos (impiden el crecimiento de los microorganismos) o bactericidas (si elimina los microorganismos)<sup>89-91</sup>.

La mayor parte de la población mundial emplea tanto las plantas naturales como sus derivados para el tratamiento de diferentes enfermedades. Las plantas presentan una gran cantidad de metabolitos secundarios que tienen actividad antimicrobiana *in vitro*, pudiéndose obtener mediante procesos variados de extracción y purificación de los principios activos. Como ejemplos de estos metabolitos secundarios tenemos a los compuestos fenólicos (como flavonoides, que pueden formar complejos con las paredes celulares bacterianas), que cuentan con varios mecanismos responsables de

toxicidad como inhibición de la enzima betaglucano-sintasa mediante compuestos oxidados, a los aceites esenciales y a los alcaloides<sup>90, 92</sup>.

Respecto a la actividad antifúngica, ésta se relaciona con la estructura química antifúngica. La ausencia de algunas moléculas resulta en pérdida de actividad de la estructura química. En otros casos, la aparición de sustituyentes halogenados cerca al anillo de imidazol o triazol aumentan la respuesta biológica. En síntesis, a partir de algunas estructuras se pueden generar otras de igual actividad farmacológica<sup>90</sup>.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **3.1.1. MATERIALES BIOLÓGICOS**

Hojas secas de *Baccharis latifolia*

Hojas, tallos y flores secas de *Schkuhria pinnata*

Cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8731, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* ATCC 10231.

##### **3.1.2. MATERIALES**

Frascos color ámbar 4L

Frascos de vidrio 250 mL

Papel filtro whatman # 42

Embudo de vidrio

Bagueta de vidrio

Cápsula de porcelana

Placa de toque de porcelana

Vaso de precipitado

Tubos de ensayo

Fiolas de vidrio

Pipetas de vidrio

Propipeta de jebe

Micropipetas

Tips para micropipeta

Viales de vidrio estériles

Gradilla

Probetas de vidrio

Microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos (BRAND)

Celda de cuarzo (ISOLAB)

### **3.1.3. EQUIPOS**

Balanza analítica (Methler Toledo y Sartorius)  
Molino de cuchillas (Thomas Wiley Mill N° 3)  
Estufa (HV Ovens)  
Equipo de filtración con bomba al vacío  
Liofilizador (LABCONCO Triad)  
Potenciómetro (Metler Toledo)  
Vortex (Scilogex)  
Espectrofotómetro UV- VIS (Hp Agilent 8453)  
Cabina de bioseguridad (Telstar Bio II Advance)  
Estufa (Incucell)

### **3.1.4. REACTIVOS**

Etanol 96°  
Agua destilada  
Etanol ACS (Merck)  
Metanol ACS (Merck)  
Tricloruro férrico ACS (Merck)  
Ácido clorhídrico fumante 37 % ACS (Merck)  
Magnesio en ralladuras (Merck)  
Nitrato de bismuto reag. Ph Eur (Merck)  
Ácido nítrico fumante reag. Ph Eur (Merck)  
Ioduro de potasio reag. Ph Eur (JT Baker)  
Iodo metálico reag. Ph Eur (JT Baker)  
Cloruro de mercurio reag. Ph Eur (Merck)  
Anhídrido acético ACS (Merck)  
Cloroformo ACS (JT Baker)  
Ácido sulfúrico PA (Merck)  
Ácido pícrico QP (Merck)  
Hidroxido de sodio PA (JT Baker)  
Hidróxido de amonio PA (JT Baker)

Ácido gálico Titration (Sigma-Aldrich)  
Reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich)  
Carbonato de sodio PA (Merck)  
2,2-difenil1-picrilhidrazilo (Sigma-Aldrich)  
Trolox Titration (Acron)  
2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (Sigma-Aldrich)  
Persulfato de potasio PA (Merck)  
Dimetilsulfoxido PA (Merck)  
Agar tripticasa soya (Merck)  
Caldo tripticasa soya (Merck)  
Caldo Mueller Hinton (Merck)  
Caldo RPMI-1640 (Merck)  
Ácido morfolino-propano sulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich)  
Cloruro de sodio PA (Merck)  
Eritromicina (USP)  
Gentamicina (USP)  
Fluconazol (USP)  
Rezasurina (Sigma-Aldrich)

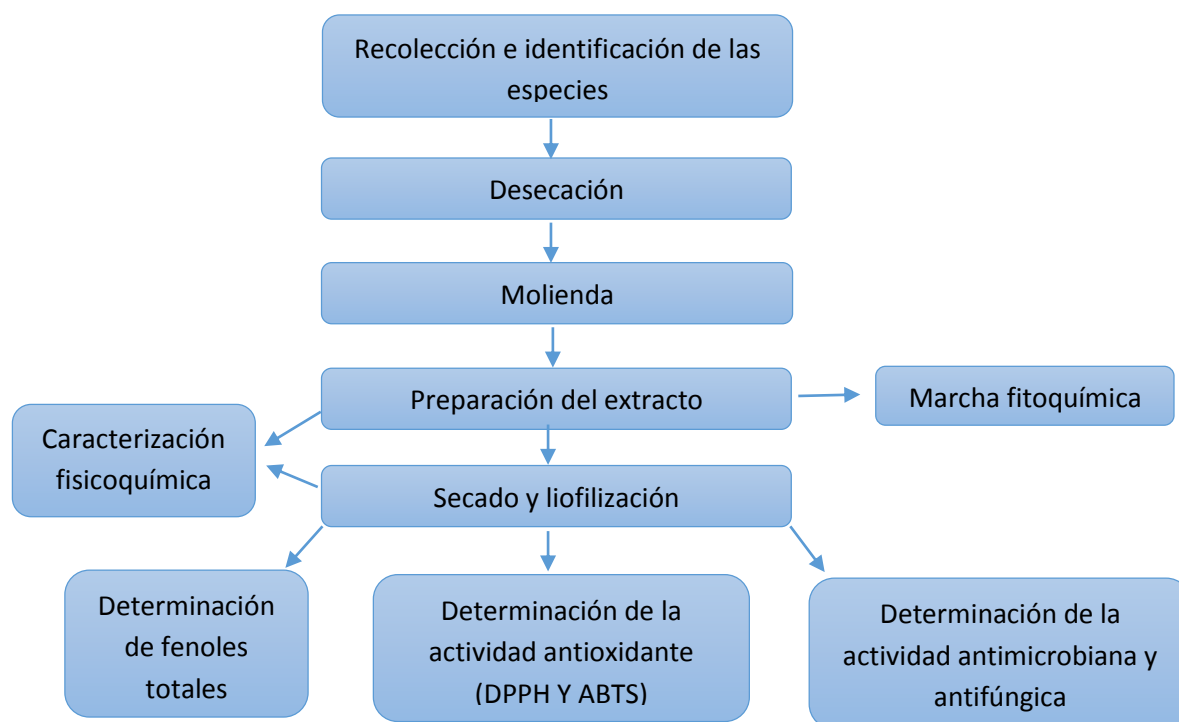
### **3.2. ENTIDADES DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN**

Se desarrolló entre los meses de junio del 2018 y febrero del 2019 en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en los laboratorios del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Juan de Dios Guevara en el cual se realizó la obtención del extracto y la marcha fitoquímica; la actividad antimicrobiana y antifungica se desarrolló en el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología Marco Antonio Garrido Malo. La caracterización fisicoquímica se realizó en el laboratorio de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud y la actividad antioxidante se desarrolló en el área de Control de Calidad del laboratorio farmacéutico Pharmadix.

### 3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación es de diseño experimental no aleatorio o cuasi-experimental, prospectivo<sup>93</sup>.

### 3.4. FLUJOGRAMA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL



**Figura 22.** Diagrama de flujo de la metodología.

### 3.5. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL

Las plantas se recolectaron en la provincia de Ambo, departamento de Huánuco (2020 msnm) durante el mes de mayo del 2018. Se tomaron las partes aéreas completas (tallos, hojas y flores) de *Schkuhria pinnata* y las hojas de *Baccharis latifolia*, y se conservó envuelto en papel kraft. Parte de las muestras fueron llevadas al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) para su identificación y clasificación taxonómica.

### 3.6. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

El material vegetal fresco y limpio de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* fue secado en estufa a 40° C por 3 días, rotando su posición cada día para un mejor secado. El material seco fue molido en un molino de cuchillas y pesado. Se procedió al macerado por 7 días a temperatura ambiente, bajo sombra y agitación mecánica en un volumen de 1000 mL de metanol por cada 100 g de muestra de *Schkuhria pinnata* (C = 100 mg/mL) y en un volumen de 1000 mL de una mezcla hidroalcohólica de agua: etanol 96° (3:7) por cada 100 g de muestra de *Baccharis latifolia* (C = 100 mg/mL). El extracto obtenido fue separado del material vegetal, filtrado al vacío a través de papel filtro Whatman #42 y concentrado en una estufa a 40° C  $\pm$  5° C; finalmente fue liofilizado y almacenado en refrigeración (2° C - 8° C)<sup>15, 94</sup>.

### 3.7. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

Se reconocieron las principales características organolépticas de los extractos secos, entre ellos, el aspecto, color y olor. Se evaluaron propiedades fisicoquímicas como pH de la muestra reconstituida<sup>20, 95</sup> y solubilidad en diferentes solventes de polaridad creciente<sup>96</sup>.

### 3.8. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

Se realizaron las siguientes reacciones para identificar metabolitos secundarios presentes en el extracto reconstituido<sup>97, 98</sup>.

**Tabla 2.** Marcha fitoquímica para la identificación de principales metabolitos secundarios.

REACCIÓN	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
Tricloruro de hierro (FeCl <sub>3</sub> )	Fenoles	Verde-marrón: derivados del catecol
		Azul: derivados del pirogalol
Shinoda	Flavonoides	Chalcona: No hay coloración
		Auronas: No hay coloración
		Isoflavanonas: No hay coloración
		Isoflavonas: Amarillo rojizo
		Flavanonas: Azul, magenta, violeta, rojo
		Flavanonoles: Rojo a magenta

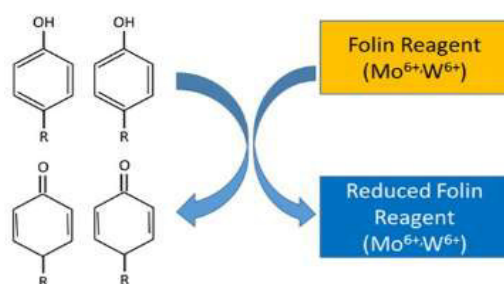


		Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo
Solución de gelatina	Taninos	Precipitado blanco denso
Dragendorff	Alcaloides	Coloración rojo-naranja
Mayer	Alcaloides	Precipitado blanco
Bertrand	Alcaloides	Precipitado blanco denso
Índice afrosimétrico o espuma	Saponinas	Altura de la espuma > 5mm después de 15 minutos de agitación
Liebermann-Burchard	Saponinas triterpénicas	Coloración verde-azul
	Saponinas esteroidales	Coloración púrpura
Baljet	Lactonas/cumarinas	Coloración rojo-anaranjado oscuro
Popoff	Alcaloides	Precipitado filamentoso
Wagner	Alcaloides	Precipitado marrón
Bornträger	Quinonas y naftoquinonas	Capa bencénica presenta coloración rojiza.

### 3.9. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

#### 3.9.1. FUNDAMENTO

Los compuestos polifenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) que contiene una mezcla de ácidos fosfomolibdico/fosfotúngstico (agentes oxidantes) para dar un complejo de color azul intenso debido a su reducción en un medio alcalino por compuestos fenólicos, cambiando el estado de valencia del metal de VI a V; midiéndose espectrofotométricamente a  $765 \text{ nm}^{94, 99}$ .



**Figura 23.** Reacción química del reactivo Folin-Ciocalteu.

### 3.9.2. PROCEDIMIENTO

#### 3.9.2.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se preparó una solución madre de estándar de ácido gálico anhidro 1000 µg/mL y a partir de ella se construyó una curva de calibración tomando las siguientes concentraciones: 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL y 50 µg/mL<sup>99</sup>.

**Tabla 3.** Dilución del estándar de ácido gálico.

TUBOS	C1	C2	C3	C4	C5	Blanco
Estándar (1 mg/mL)	1 mL	3 mL	1 mL	1 mL	1 mL C3	-
Agua c.s.p	20 mL	100 mL	50 mL	100 mL	10 mL	-
Concentración	50 µg/mL	40 µg/mL	30 µg/mL	20 µg/mL	10 µg/mL	0 µg/mL

#### 3.9.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se diluyó 200 mg del extracto seco en 5000 µL del diluyente metanol 70 % y se llevó a baño maría a 70° C para su homogeneización. Se agilizó la mezcla en vortex y seguidamente se mantuvo en calor por diez minutos adicionales. Se dejó enfriar y se llevó a centrifugar a 3500 RPM por diez minutos. Se tomó el sobrenadante y se aforó a 10 mL con diluyente. Se tomó 1000 µL de esta solución y se aforó en una fiola de 100 mL con agua destilada (Cf = 0,2 mg/mL)<sup>99</sup>. La preparación se realizó por duplicado.

#### 3.9.2.3. PREPARACIÓN DE LA BATERÍA DE LECTURA

En un tubo de ensayo se colocó 1000 µL de la solución muestra, 1000 µL de cada dilución del estándar de ácido gálico y 1000 µL de agua destilada con 5000 µL de la solución reactivo Folin-Ciocalteu al 10 % y se mezcló. Tras cinco minutos, se añadió 4000 µL de solución de carbonato de sodio 7,5 % (w/v) en agua destilada. Se mezcló y se mantuvo en reposo por 60 minutos a 25° C en oscuridad<sup>99</sup>.

### 3.9.2.4. LECTURA DE RESULTADOS

Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro UV-VIS a 765 nm. La concentración de fenoles totales se calculó mediante la interpolación de la curva patrón de ácido gálico y se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico entre miligramos de extracto seco<sup>94, 99, 100</sup>.

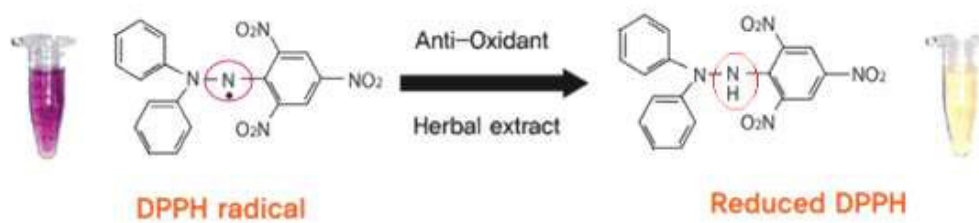
$$C \text{ (eq.mg ácido gálico)} = \text{Concentración (mg/mL)} * \text{Factor de dilución}$$

## 3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

### 3.10.1. MÉTODO 2,2-DIFENIL1-PICRILHIDRAZILLO (DPPH)

#### 3.10.1.1. FUNDAMENTO

Se fundamenta en la reacción de coloración desarrollada por el radical libre estable 2,2-difenil1-picrilhidrazilo el cual tiene un electrón desapareado en su órbita exterior y se evidencia por su coloración púrpura. Al reaccionar con una molécula donadora de átomos de hidrógeno (sustancia antioxidante), reduce la estructura cambiándola a color amarillo, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm en metanol<sup>101, 102</sup>.



**Figura 24.** Reacción química entre el radical DPPH y una sustancia antioxidante donadora de electrones.

#### 3.10.1.2. PROCEDIMIENTO

##### 3.10.1.2.1. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DPPH

El reactivo DPPH se preparó a 0,1 mmol/L (0,0394 mg/mL)<sup>103</sup> en metanol y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### 3.10.1.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El extracto vegetal se reconstituyó en metanol obteniéndose una concentración madre de 1 mg/mL y se realizó una serie de diluciones entre 25 - 400 µg/mL, La preparación se realizó por duplicado (Ver Tabla 4 y 5).

**Tabla 4.** Dilución del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*: método DPPH.

TUBOS	C1	C2	C3	C4	C5	Blanco
Extracto (10 mg/mL)	1 mL	1 mL	5 mL	7mL	4 mL	-
Metanol c.s.p	20 mL	10 mL	20 mL	20 mL	10 mL	5 mL
Concentración	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	350 µg/mL	400 µg/mL	0 µg/mL

**Tabla 5.** Dilución del extracto hidroalcoholico de *Baccharis latifolia*: método DPPH.

TUBOS	C1	C2	C3	C4	C5	Blanco
Extracto (10 mg/mL)	5 mL C4	5 mL C4	15 mL C4	2mL	2,5 mL	-
Metanol c.s.p	20 mL	10 mL	20 mL	20 mL	20 mL	5 mL
Concentración	25 µg/mL	50 µg/mL	75 µg/mL	100 µg/mL	125 µg/mL	0 µg/mL

### 3.10.1.2.3. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

El estándar de trolox se diluyó en metanol a una concentración madre de 0,5 mg/mL de la cual se preparó una serie de diluciones entre 1 - 10 µg/mL<sup>104</sup>. La preparación se realizó por duplicado.

**Tabla 6.** Dilución del estándar: método DPPH.

TUBOS	C1	C2	C3	C4	C5	Blanco
<b>Estándar (0,5 mg/mL)</b>	1 mL C5	2 mL C5	5 mL C5	8 mL C5	1 mL	-
<b>Metanol c.s.p</b>	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	50 mL	-
<b>Concentración</b>	1 µg/mL	2 µg/mL	5 µg/mL	8 µg/mL	10 µg/mL	0 µg/mL

#### **3.10.1.2.4. PREPARACIÓN DE LA BATERÍA DE LECTURA**

Se adicionó en cada tubo de ensayo una proporción 1000 µL de muestra o estándar y 2000 µL de la solución ajustada de DPPH 0,1 mmol/L, y se dejó incubar por 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

#### **3.10.1.2.5. LECTURA DE RESULTADOS**

Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro UV-VIS a 517 nm. El blanco utilizado fue metanol: Sol. DPPH (1:2), cuya absorbancia fue restada en cada absorbancia muestra.

#### **3.10.1.2.6. CÁLCULO DEL IC<sub>50</sub> Y TEAC**

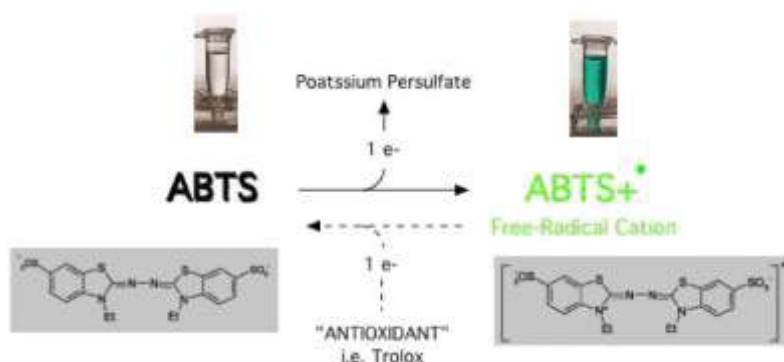
Se obtuvo el porcentaje de captación de radicales libres y la concentración media inhibitoria IC<sub>50</sub> mediante la ecuación de la recta obtenida de la relación de las variables concentración (X) y % CSRL (Y). Por otro lado, el TEAC (actividad equivalente a trolox en µg/µg muestra) fue calculado mediante la relación entre el IC<sub>50</sub> del estándar y el IC<sub>50</sub> de las respectivas muestras<sup>105, 106</sup>.

$$\% \text{ CSRL} = [(1 - \text{ABS}_{\text{MP}}) / \text{ABS}_{\text{ABTS}+}] \times 100$$

### 3.10.2. MÉTODO 2,2-AZINO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-ÁCIDO SULFÓNICO (ABTS<sup>•+</sup>)

#### 3.10.2.1. FUNDAMENTO

Se fundamenta en la reacción del radical ABTS<sup>•+</sup> obtenido tras la reacción del cromóforo verde azulado ABTS 7 mM (3,6 mg/mL) y persulfato potásico 2,45 mM (0,66229 mg/mL) incubados por 16 horas a temperatura ambiente (20° C- 25° C) en oscuridad. El ABTS oxidado o ABTS<sup>•+</sup> en presencia de una molécula captadora de radicales libres se decolora a una sustancia a color amarillento<sup>105, 107</sup>.



**Figura 25.** Reacción química entre el radical ABTS y la especie donante de electrones.

#### 3.10.2.2. PROCEDIMIENTO

##### 3.10.2.2.1. PREPARACIÓN DEL REACTIVO ABTS<sup>•+</sup>

Se pesó una cantidad adecuada del reactivo ABTS para obtener una solución 7 mM (3,6 mg/mL) y persulfato potásico 2,45 mM (0,66229 mg/mL) el cual fue incubado por 16 horas a temperatura ambiente (20° C - 25° C) y en oscuridad con el fin de obtener el radical ABTS<sup>•+</sup>; después de ello, se diluyó con agua destilada hasta obtener una absorbancia de  $0,7 \pm 0,02$  a 734 nm en el espectrofotómetro UV-Vis<sup>107</sup>.

##### 3.10.2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El extracto vegetal se reconstituyó en etanol obteniéndose una concentración madre de 10 mg/mL y se realizó una serie de diluciones entre 50 - 1000 µg/mL, La preparación se realizó por duplicado.

**Tabla 7.** Dilución de los extractos método ABTS<sup>•+</sup>.

TUBOS	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Blanco
<b>Extracto (10 mg/mL)</b>	1 mL	2 mL	3 mL	5 mL C1	1 mL	10 mL C5	-
<b>Etanol c.s.p</b>	10 mL	25 mL	50 mL	20 mL	100 mL	20 mL	-
<b>Concentración</b>	1000 μg/mL	800 μg/mL	600 μg/mL	250 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	0 μg/mL

**3.10.2.2.3. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR**

El estándar de trolox se diluyó en etanol a una concentración madre de 1 mg/mL de la cual se prepararon una serie de diluciones entre 30 - 100 μg/mL. La preparación se realizó por duplicado.

**Tabla 8.** Dilución del estándar método ABTS<sup>•+</sup>.

TUBOS	C1	C2	C3	C4	C5	Blanco
<b>Estándar (1 mg/mL)</b>	1 mL	2 mL	3 mL	1 mL C1	3 mL	-
<b>Etanol c.s.p</b>	10 mL	25 mL	50 mL	20 mL	100 mL	-
<b>Concentración</b>	100 μg/mL	80 μg/mL	60 μg/mL	50 μg/mL	30 μg/mL	0 μg/mL

**3.10.2.2.4. PREPARACIÓN DE LA BATERÍA DE LECTURA**

Se adicionó en cada tubo de ensayo una proporción 100 μL de muestra o estándar y 2900 μL de la solución ajustada de ABTS<sup>•+</sup> 7 mM, se dejó incubar por siete minutos en oscuridad y a temperatura ambiente<sup>108</sup>.

**3.10.2.2.5. LECTURA DE RESULTADOS**

Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro UV-VIS a 734 nm. El blanco utilizado fue etanol: Sol. ABTS<sup>•+</sup> 7 mM (1:29) la cual fue restada en cada absorbancia muestra.

### 3.10.2.2.6. CÁLCULO DEL IC<sub>50</sub> Y TEAC

Se obtuvo el porcentaje de captación de radicales libres y la concentración media inhibitoria IC<sub>50</sub> mediante la ecuación de la recta obtenida de la relación de las variables concentración y % CSRL. Por otro lado, el TEAC (actividad equivalente a trolox en µg/µg muestra) fue calculado mediante la relación entre el IC<sub>50</sub> del estándar y el IC<sub>50</sub> de las respectivas muestras.<sup>106, 107, 109</sup>.

$$\% \text{ CSRL} = [(1 - \text{ABS}_{\text{MP}}) / \text{ABS}_{\text{ABTS}+}] \times 100$$

### 3.11. MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA ANÁLISIS

Los resultados se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) y a la Prueba de Tukey para hallar diferencia entre las medias y el resultado de absorbancias, considerándose valores significativos de  $p < 0.05$ .

### 3.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN COLORIMÉTRICA

#### 3.12.1. FUNDAMENTO

Este método se basa en una reacción colorimétrica para hallar la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (CMI) gracias a la resazurina, un colorante redox de color púrpura empleado en numerosos ensayos de citotoxicidad. Las células bacterianas metabólicamente activas pueden reducir la resazurina no fluorescente (púrpura) a la resoflurina fluorescente (rosada), dando una medida cuantificable directa de la actividad metabólica bacteriana<sup>110</sup>.

La concentración media inhibitoria es un valor no absoluto, sino, se rige entre la menor concentración de inhibición y la siguiente menor concentración, definido como la concentración más baja de agente microbiano que impide el crecimiento bacteriano en condiciones de crecimiento óptimas. La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se rige bajo el protocolo CLSI M07- A10 y la determinación de la susceptibilidad antimicótica bajo el protocolo CLSI M27- A3 y algunas modificaciones de Liu M, et Al (2007)<sup>111-114</sup>.

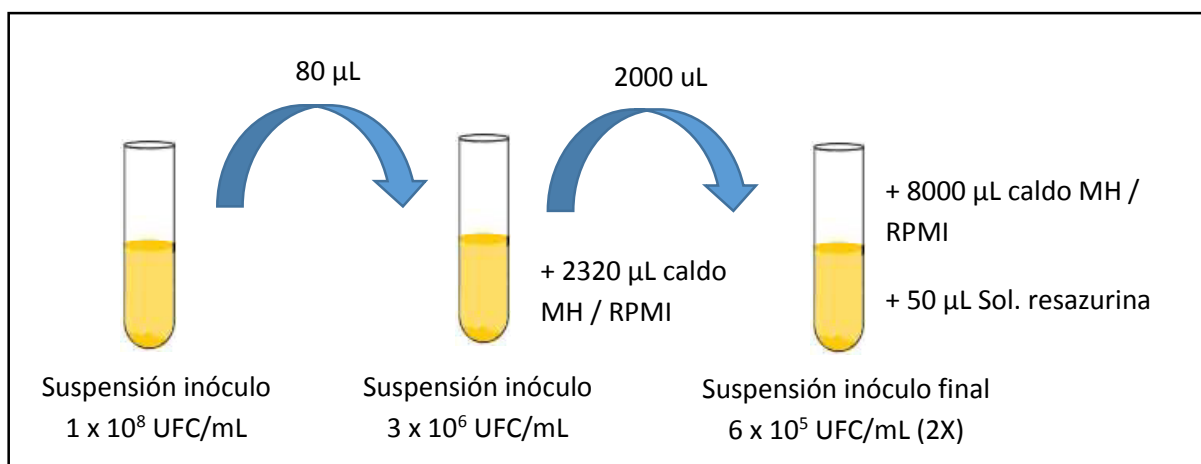


### 3.12.2. MICROORGANISMOS DE ESTUDIO

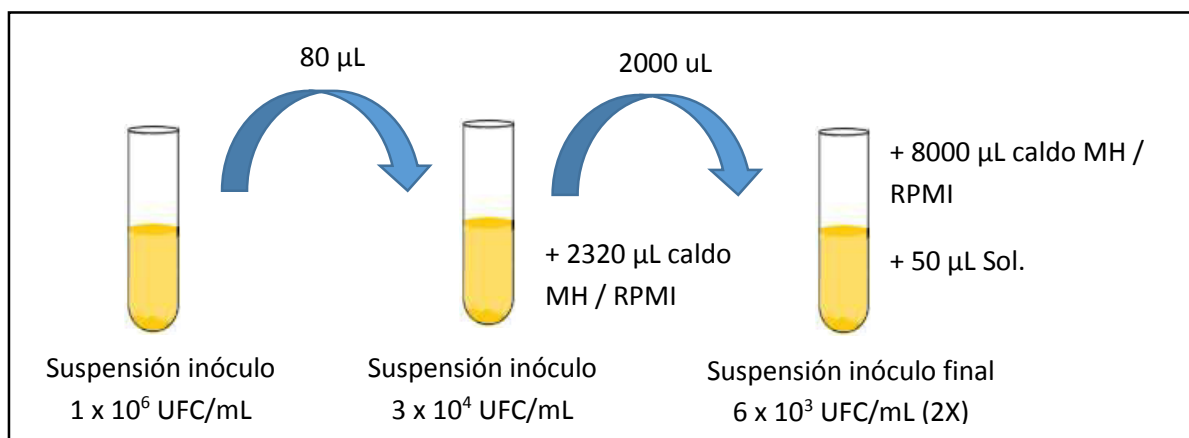
Las cepas de ensayo procedieron del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Cepas de estudio: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8731, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* ATCC 10231.

### 3.12.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se preparó una concentración estandarizada de los microorganismos en estudios previamente cultivado 24 horas en agar tripticasa soya TSA (para bacterias) y agar Sabouraud dextrosa (para hongos) en solución salina estéril 0.85 % hasta asemejar la turbidez del tubo 0.5 de la escala de McFarland, equivalente a aproximadamente  $1 - 2 \times 10^8$  UFC/mL para bacterias y  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL para hongos. Seguidamente se realizaron diluciones de la suspensión de inóculo con caldo Mueller Hinton hasta llegar a la concentración aproximada de  $6 \times 10^5$  UFC/mL (doble seriada 2X) para bacterias y con caldo RPMI-1640 hasta llegar a la concentración aproximada de  $6 \times 10^3$  UFC/mL (doble seriada 2X) para hongos. Además, por cada 10 mL de suspensión del inóculo, se añadió 50  $\mu$ L de solución de resazurina 20 mg/mL<sup>111, 112, 114</sup>.



**Figura 26.** Esquema de dilución del inóculo de bacterias.



**Figura 27.** Esquema de dilución del inóculo de hongos.

### 3.12.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se preparó el extracto de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* “stock” (200 mg/mL) tomando como reconstituyente DMSO 10% del cual se realizaron diluciones con concentraciones finales entre 4000 µg/mL a 7,81 µg/mL en viales estériles, de los cuales se tomó respectivamente 1:50 de muestra y caldo Mueller Hinton o RPMI-1640<sup>115</sup>. Al caldo Mueller Hinton se le añadió 2 % de NaCl cuando se trabajó con inóculo de *Staphylococcus aureus* y al caldo RPMI-1640 se suplementó con 0,165 mol/L de 3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico (MOPS), finalmente se ajustó a pH 7 con hidróxido de sodio 1N<sup>111, 112</sup>.

**Tabla 9.** Esquema de trabajo de las diluciones de los extractos.

TUBO	FUENTE		SOLVENTE (DMSO 10%)	Concentración intermedia	Concentración final (1:50) en caldo MH / RPMI-1640
1	Stock madre	-	-	200000 µg/mL	4000 µg/mL
2		500 µL	500 µL	100000 µg/L	2000 µg/mL
3		500 µL	1500 µL	50000 µg/L	100 µg/mL
4		500 µL	3500 µL	25000 µg/L	500 µg/mL
5	Tubo 4	500 µL	500 µL	12500 µg/L	250 µg/mL
6		500 µL	1500 µL	6250 µg/L	125 µg/mL
7		500 µL	3500 µL	3125 µg/L	62,50 µg/mL
8	Tubo 7	500 µL	500 µL	1562,5 µg/L	31,25 µg/mL
9		500 µL	1500 µL	781,25 µg/L	15,63 µg/mL
10		500 µL	3500 µL	390,625 µg/L	7,81 µg/mL

### 3.12.5. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Para eritromicina, fluconazol y gentamicina se realizaron diluciones comprendidas entre 0,125-64 µg/mL. Se partió de concentraciones madre de eritromicina 6,4 mg/mL en etanol 96º, gentamicina 640 µg/mL y fluconazol 640 µg/mL en agua destilada. Las diluciones intermedias doble-seriadas se realizaron siguiendo los esquemas de dilución 8A y 8B de la guía CLSI M100<sup>116</sup> teniendo en cuenta la solubilidad del agente antimicrobiano y la guía CLSI M27-A2<sup>112</sup> para la dilución del agente antifúngico soluble en agua. Al caldo Mueller Hinton se le añadió 2 % de NaCl cuando se trabajó con inóculo de *Staphylococcus aureus* y al caldo RPMI-1640 se suplementó con 0,165 mol/L de MOPS (3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico), finalmente se ajustó a pH 7 con hidróxido de sodio 1N<sup>111,112</sup>.

**Tabla 10.** Dilución del estándar de Gentamicina

TUBO	FUENTE		CALDO MH	Concentración
1	Stock madre	200 µL	1800 µL	64 µg/mL
2	Tubo 1	500 µL	500 µL	32 µg/mL
3		250 µL	750 µL	16 µg/mL
4		200 µL	1400 µL	8 µg/mL
5	Tubo 4	500 µL	500 µL	4 µg/mL
6		250 µL	750 µL	2 µg/mL
7		200 µL	1400 µL	1 µg/mL
8	Tubo 7	500 µL	500 µL	0,5 µg/mL
9		250 µL	750 µL	0,25 µg/mL
10		200 µL	1400 µL	0,125 µg/mL

**Tabla 11.** Dilución del estándar de Eritromicina

TUBO	FUENTE		SOLVENTE (Alcohol 95%)	Concentración intermedia	Concentración final (1:100) en caldo MH
1	Stock madre	-	-	6400 µg/mL	64 µg/mL
2		500 µL	500 µL	3200 µg/mL	32 µg/mL
3		500 µL	1500 µL	1600 µg/mL	16 µg/mL
4		500 µL	3500 µL	800 µg/mL	8 µg/mL
5	Tubo 4	500 µL	500 µL	400 µg/mL	4 µg/mL
6		500 µL	1500 µL	200 µg/mL	2 µg/mL
7		500 µL	3500 µL	100 µg/mL	1 µg/mL
8	Tubo 7	500 µL	500 µL	50 µg/mL	0,5 µg/mL
9		500 µL	1500 µL	25 µg/mL	0,25 µg/mL
10		500 µL	3500 µL	12,5 µg/mL	0,125 µg/mL

**Tabla 12.** Dilución del estándar de Fluconazol

TUBO	FUENTE	CALDO RPMI-1640	Concentración intermedia	Concentración final (1:10) en caldo RPMI-1640
1	Stock madre	-	-	640 µg/mL
2		500 µL	500 µL	320 µg/mL
3		1000 µL	3000 µL	160 µg/mL
4	Tubo 3	500 µL	500 µL	80 µg/mL
5		500 µL	1500 µL	40 µg/mL
6		500 µL	3500 µL	20 µg/mL
7	Tubo 6	500 µL	500 µL	10 µg/mL
8		500 µL	1500 µL	5 µg/mL
9		500 µL	3500 µL	2,5 µg/mL
10	Tubo 9	500 µL	500 µL	1,25 µg/mL

**3.12.6. SEMBRADO EN LAS MICROPLACAS**

Se inoculó en los pocillos de la microplaca estéril de poliestireno una proporción de 1:1 del agente antimicrobiano diluido y el inóculo bacteriano o fúngico para un volumen total de 200 µL por triplicado. Se realizó también controles de crecimiento (GC) y controles de esterilidad (SC). La incubación se realizó a condiciones de 35° C ± 2° C por 16 – 20 h para las bacterias y 35° C ± 2° C por 24 h para hongos.

**Tabla 13.** Esquema de trabajo de las proporciones para inocular en los pocillos con inóculo bacteriano.

Pocillo	Dilución muestra	Medio (MH)	Inóculo Bacteriano (2X)	Cf inóculo (X)	Volumen de pocillo
MP <sub>B</sub>	100 µL	-	100 µL	3 x 10 <sup>5</sup> UFC/mL	200 µL
GC <sub>B</sub>	-	100 µL	100 µL	3 x 10 <sup>5</sup> UFC/mL	200 µL
SC	-	200 µL	-	-	200 µL

Leyenda: MP<sub>B</sub>: Muestra problema actividad antimicrobiana; GC<sub>B</sub>: Control de crecimiento bacteriano; SC: Control de esterilidad.

**Tabla 144.** Esquema de trabajo de las proporciones para inocular en los pocillos con inóculo fúngico.

Pocillo	Dilución muestra	Medio (RPMI-1640)	Inóculo Fúngico (2x)	Cf inóculo (X)	Volumen de pocillo
MP <sub>H</sub>	100 µL	-	100 µL	3 x 10 <sup>3</sup> UFC/mL	200 µL
GC <sub>H</sub>	-	100 µL	100 µL	3 x 10 <sup>3</sup> UFC/mL	200 µL
SC	-	200 µL	-	-	200 µL

Leyenda: MP<sub>H</sub>: Muestra problema actividad antifúngica; GC<sub>H</sub>: Control de crecimiento fúngico; SC: Control de esterilidad.

### 3.12.7. LECTURA DE RESULTADOS

Se realizó visualmente en la cabina de bioseguridad. El viraje de púrpura a rosado o incoloro se registró como positivo y la CMI como la concentración más baja a la que no se produce el viraje<sup>114</sup>.

### 3.12.8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

La actividad antioxidante se clasificó según el valor de la CMI, tomándose en cuenta los parámetros de Holetz FB. et al<sup>138</sup>. La actividad es significativa al ser  $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$ ; presenta débil actividad 500-1000  $\mu\text{g/mL}$ , moderada actividad  $< 500 \mu\text{g/mL}$  y buena actividad  $< 100 \mu\text{g/mL}$ .

### 3.12.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por triplicado en el caso de las muestras y duplicado en caso de los estándares. Se realizó la determinación de la media y desviación estándar ( $\pm$  D.E), de este modo, el valor de CMI se reportó como el promedio de las lecturas y su desviación estándar.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS

Las tablas 14, 15 y 16 muestran las características sensoriales, solubilidad y pH de las muestras trabajadas. Para el ensayo de pH se utilizó un electrodo marca Metrohm código 6.0258.600 y se registraron las lecturas a 25° C; además, se realizó una verificación intermedia con buffers de pH 2, 5 y 9.

**Tabla 15.** Características organolépticas de los extractos en estudio.

<b>Características organolépticas</b>	<b>Extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i></b>	<b>Extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i></b>
Aspecto	En solución: líquido translúcido. Como extracto liofilizado: sólido pastoso	En solución: líquido translúcido. Como extracto liofilizado: sólido pastoso
Color	En solución: dorado. Como extracto liofilizado: marrón.	En solución: verde oliva. Como extracto liofilizado: marrón.
Olor	Sui generis, penetrante	Sui generis
Sabor	Amargo astringente	Amargo picante

**Tabla 16.** Solubilidad de los extractos secos en estudio.

<b>Solvente</b>	<b>Extracto de <i>Baccharis latifolia</i></b>	<b>Extracto de <i>Schkuhria pinnata</i></b>
Tolueno	Insoluble	Insoluble
Cloroformo	Insoluble	Insoluble
Acetona	Insoluble	Insoluble
Etanol	Soluble	Soluble
Metanol	Soluble	Soluble
Agua	Soluble	Moderadamente soluble

**Tabla 17.** pH de los extractos en estudio.

Muestra	pH
Extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i>	5.60
Extracto metanólico de <i>Schkuhria pinnata</i>	6.38

#### 4.2. SCREENING FITOQUÍMICO

Los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* y metanólico de *Schkuhria pinnata* se presentan en las tablas 17 y 18, evidenciando la presencia de fenoles, lactonas, taninos, flavonoides y antraquinonas en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* y la presencia de fenoles, lactonas, taninos, flavonoides y triterpenos en el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*.

**Tabla 18.** Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*.

Reacción	Metabolito secundario	Resultado
Tricloruro férrico	Fenoles	++++
Dragendorff	Alcaloides	-
Bertrand	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
Popoff	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Baljet	Lactonas/cumarinas	+++
Gelatina	Taninos	+++
Shinoda	Flavonoides	+++
Índice de espuma	Saponinas	-
Liebermann-Burchard	Saponinas esteroides- triterpenos	-
Bornträger	Naftoquinonas-Antraquinonas	+++

Leyenda: (++++ ) Muy abundante, (+++) Abundante, (++) Moderado, (+) Leve, (-) Ausencia

**Tabla 19.** Marcha fitoquímica del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*.

Reacción	Metabolito secundario	Resultado
Tricloruro férrico	Fenoles	++++
Dragendorff	Alcaloides	-
Bertrand	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	+
Popoff	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Baljet	Lactonas/cumarinas	+++
Gelatina	Taninos	+++
Shinoda	Flavonoides	+++
Índice de espuma	Saponinas	+
Liebermann-Burchard	Saponinas triterpénicas	++
Bornträger	Naftoquinonas-Antraquinonas	-

Leyenda: (++++), Muy abundante, (+++) Abundante, (++) Moderado, (+) Leve, (-) Ausencia

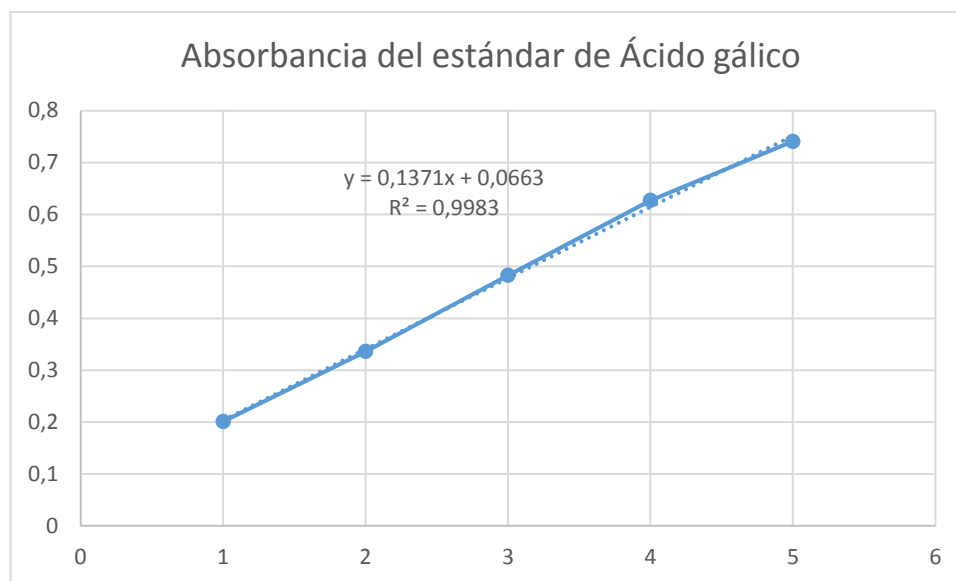
#### 4.3. POLIFENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

La cuantificación de polifenoles totales en los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* se determinaron a partir de la curva de calibración de ácido gálico presentado en la figura 28. Se observa en la tabla 21 que el extracto seco de *Baccharis latifolia* presenta mayor cantidad de polifenoles totales que el extracto de *Schkuhria pinnata* expresado en equivalente a mg de ácido gálico en mg de muestra.

**Tabla 20.** Resultados de absorbancia de ácido gálico.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
1	0.201
2	0.336
3	0.483
4	0.627
5	0.741





**Figura 28.** Curva de calibración del ácido gálico, eje abscisas (x) concentración del estándar y eje ordenadas (y) absorbancia medida a 765 nm.

**Tabla 21.** Resultados obtenidos equivalente mg ácido gálico/mg muestra.

	Absorbancia	Concentración mg/mL (curva de calibración)	Equivalente mg ac. Gálico/mg muestra
Extracto <i>Schkuhria pinnata</i>	0.1985	0.9643	4.8213
Extracto <i>Baccharis latifolia</i>	0.3400	1.9964	9.9818

#### 4.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

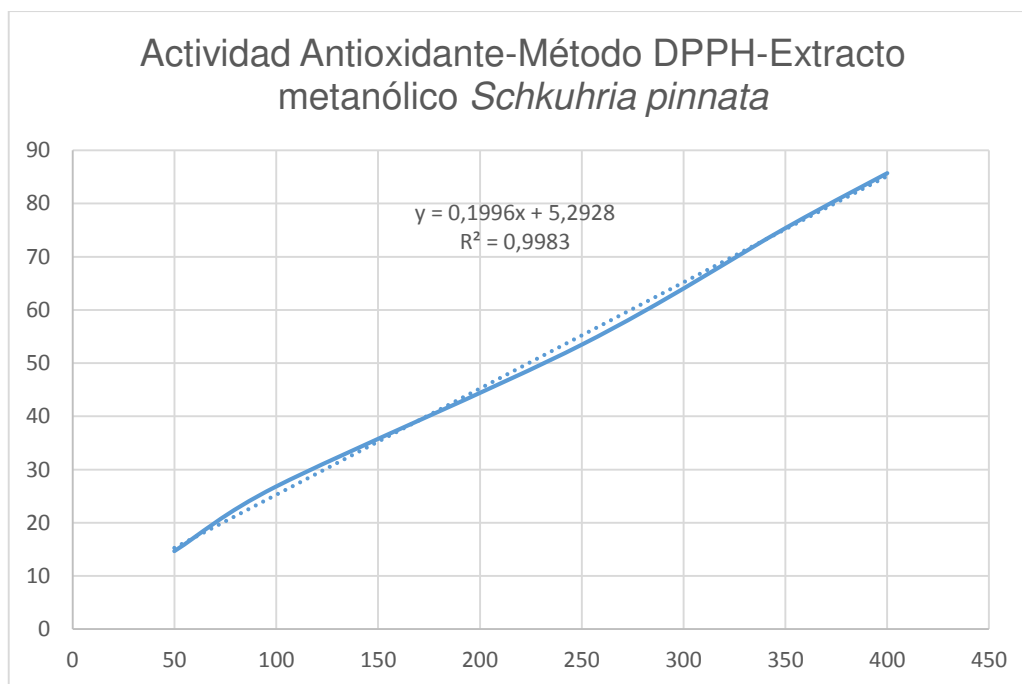
##### 4.4.1. MÉTODO 2,2-DIFENIL1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

Los resultados de la determinación de la actividad antioxidante por el método 2,2-difenil1-picrilhidrazilo (DPPH) de los extractos metanólico de *Schkuhria pinnata* e hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* se muestran en las figuras 29 y 30, y en las tablas 21 y 22.

La tabla 23 y figura 31 muestran los resultados del estándar trolox. En la tabla 24 se aprecia los resultados obtenidos de ambos extractos, el estándar y la actividad equivalente en trolox por muestra TEAC, evidenciándose una actividad antioxidante mayor para el extracto de *Baccharis latifolia*, al tener una mayor TEAC y menor IC<sub>50</sub>.

**Tabla 22.** Resultados del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*: método DPPH.

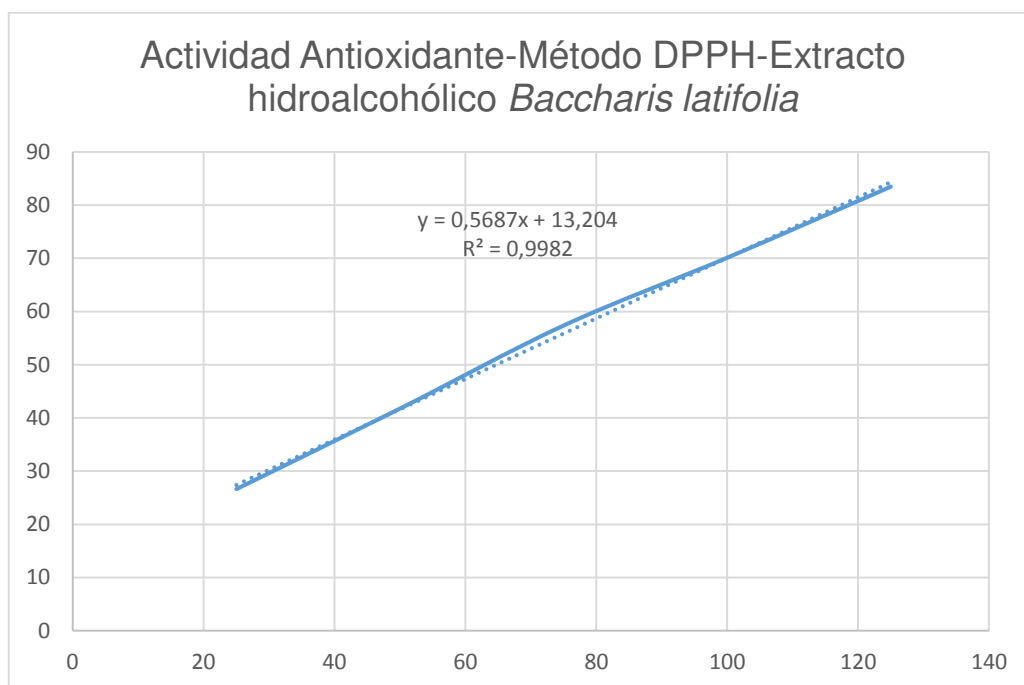
Concentración (µg/mL)	Absorbancia	% CSRL	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
0	0.84769	0	223.98397
50	0.72346	14.65542	
100	0.62048	26.80343	
250	0.39447	53.46589	
350	0.20864	75.35782	
400	0.12112	85.71176	



**Figura 29.** Gráfico Concentración (µg/mL) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*.

**Tabla 23.** Resultados del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*: método DPPH.

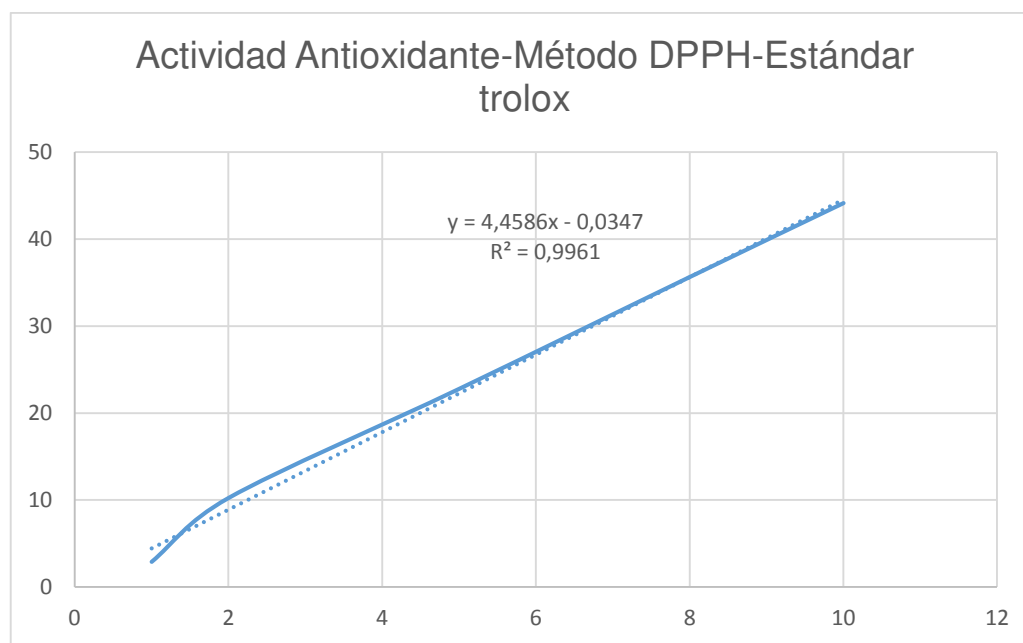
Concentración (µg/mL)	Absorbancia	% CSRL	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
0	0.77622	0	64.70195
25	0.56982	26.59104	
50	0.45230	41.73044	
75	0.33100	57.35754	
100	0.23198	70.11414	
125	0.12820	83.48471	



**Figura 30.** Gráfico Concentración (µg/mL) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*.

**Tabla 24.** Resultados del trolox (patrón) por el método DPPH.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia	% CSRL	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	0.73288	0	11.22207
1	0.71156	2.90909	
2	0.65777	10.24868	
5	0.56585	22.79106	
8	0.47158	35.65342	
10	0.40933	44.14736	



**Figura 31.** Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH del estándar trolox.

**Tabla 25.** Resultados expresados en IC<sub>50</sub> y TEAC por el método DPPH.

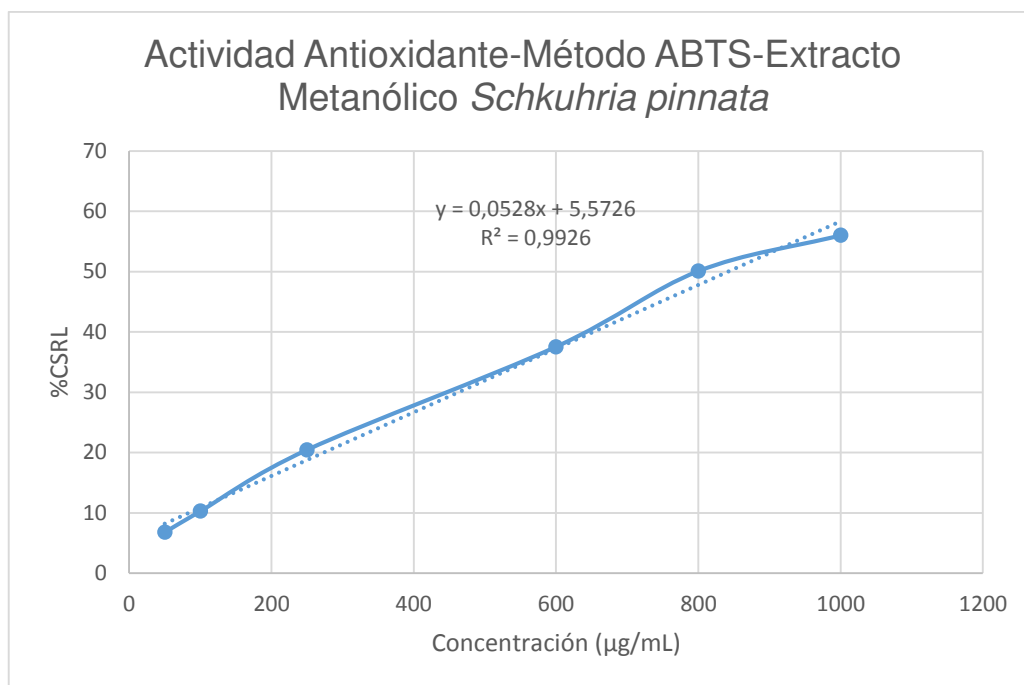
	IC <sub>50</sub>	TEAC
Extracto <i>Schkuhria pinnata</i>	223.98397 µg/mL	0.05010 µg trolox/µg muestra
Extracto <i>Baccharis latifolia</i>	64.70195 µg/mL	0.17344 µg trolox/µg muestra
Trolox	11.22207 µg/mL	-

#### 4.4.2. MÉTODO 2,2-AZINO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-ÁCIDO SULFÓNICO) (ABTS<sup>•+</sup>)

Los resultados de la determinación de la actividad antioxidante por el método 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>) de los extractos metanólico de *Schkuhria pinnata* e hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* se muestran en las figuras 32 y 33, y en las tablas 25 y 26. La tabla 27 y figura 34 muestran los resultados obtenidos del estándar trolox. En la tabla 28 se aprecia los resultados obtenidos de ambos extractos, el estándar y la actividad equivalente en trolox por muestra TEAC, evidenciándose una actividad antioxidante mayor para el extracto de *Baccharis latifolia*, al tener un mayor TEAC y menor IC<sub>50</sub>.

**Tabla 26.** Resultados del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*: método ABTS<sup>•+</sup>.

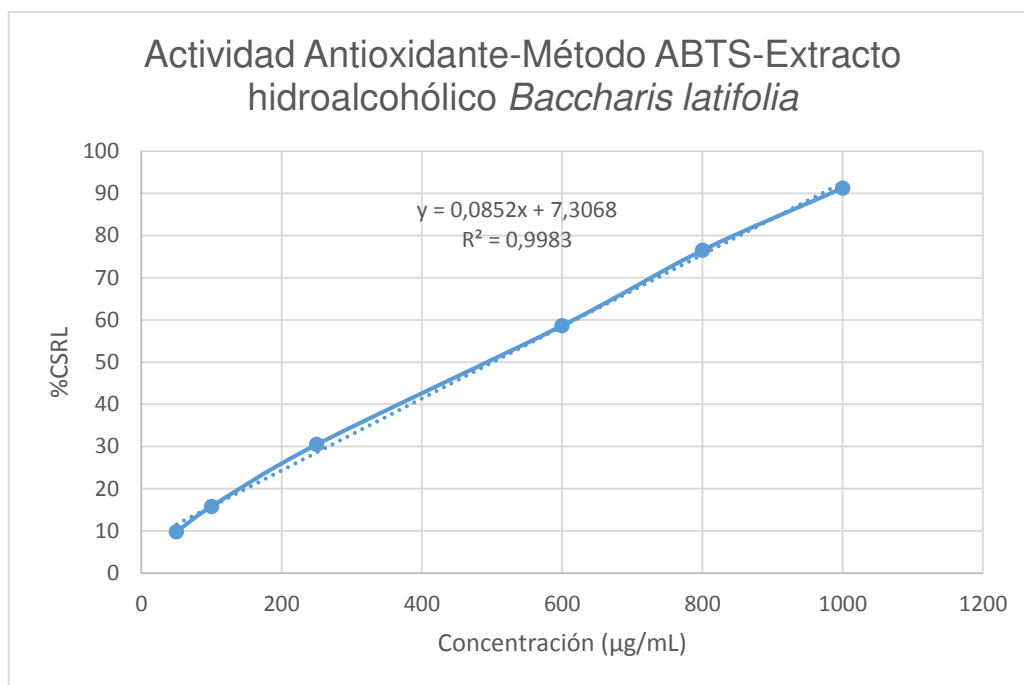
Concentración (µg/mL)	Absorbancia	% CSRL	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
0	0.69611	0	842.06596
50	0.64885	6.78916	
100	0.62452	10.28429	
250	0.55367	20.46228	
600	0.43476	37.54435	
800	0.34750	50.07973	
1000	0.30619	56.01414	



**Figura 32.** Gráfico Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*.

**Tabla 27.** Resultados del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*: método ABTS $\cdot^+$ .

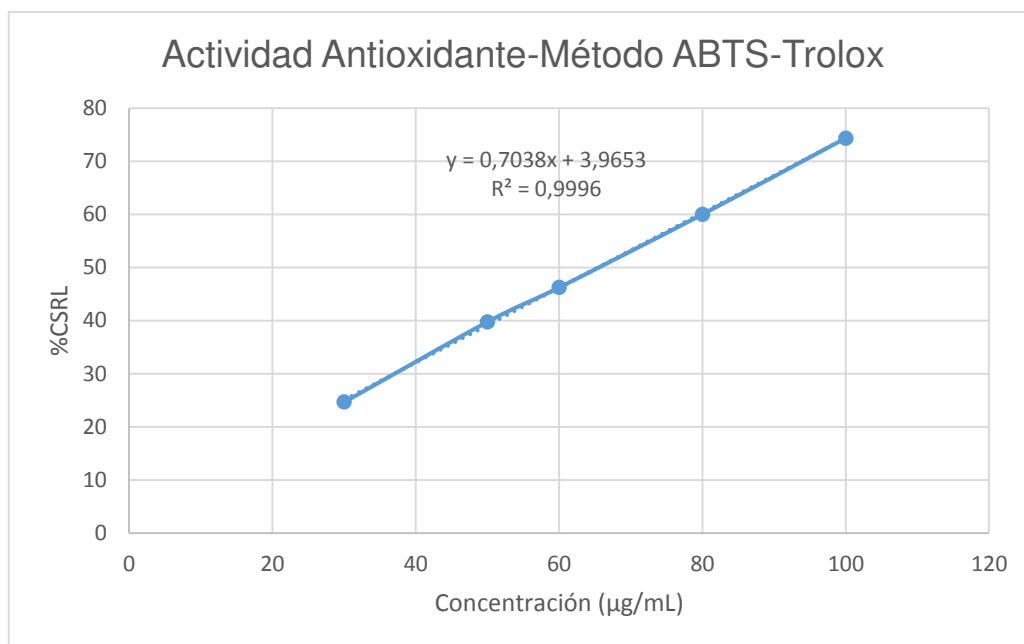
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia	% CSRL	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	0.70475	0	501.09390
50	0.63564	9.80631	
100	0.59326	15.81979	
250	0.48996	30.47747	
600	0.29153	58.63356	
800	0.16582	76.47109	
1000	0.06186	91.22242	



**Figura 33.** Gráfico Concentración (µg/mL) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*.

**Tabla 28.** Resultados del trolox por método ABTS<sup>•+</sup>.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia	% CSRL	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
0	0.70475	0	65.41509
30	0.53077	24.68677	
50	0.42445	39.77297	
60	0.37883	46.24619	
80	0.28199	59.98726	
100	0.18083	74.34126	



**Figura 34.** Gráfico Concentración (µg/mL) vs % CSRL (Capacidad Secuestrante de Radicales Libres) para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS del trolox (patrón).

**Tabla 29.** Resultados expresados en IC<sub>50</sub> y TEAC por el método ABTS<sup>•+</sup>.

	IC <sub>50</sub>	TEAC
Extracto <i>Schkuhria pinnata</i>	842.06596 µg/mL	0.07768 µg trolox/µg muestra
Extracto <i>Baccharis latifolia</i>	501.09390 µg/mL	0.13053 µg trolox/µg muestra
Trolox	65.41509 µg/mL	-

#### 4.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados de la determinación de la CMI por el método de microdilución colorimétrica de los extractos metanólico de *Schkuhria pinnata* e hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* se presentan en las figuras del 35 al 40 y en la tabla 30.

En las figuras 35 y 36, así como en la tabla 30, se observa que el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* presenta una CMI de 2000 µg/mL y el extracto hidroalcohólico

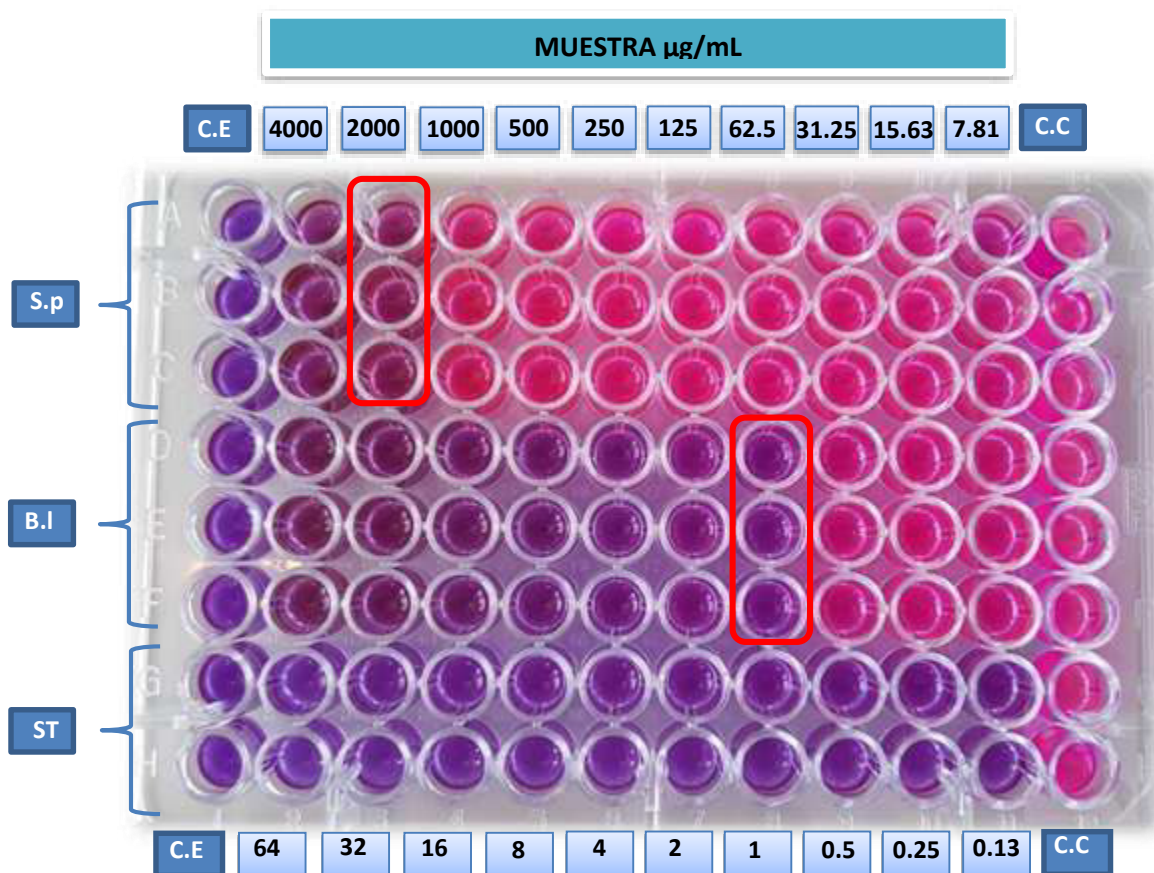


de *Baccharis latifolia* presenta una CMI de 62.5  $\mu\text{g/mL}$  tanto contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

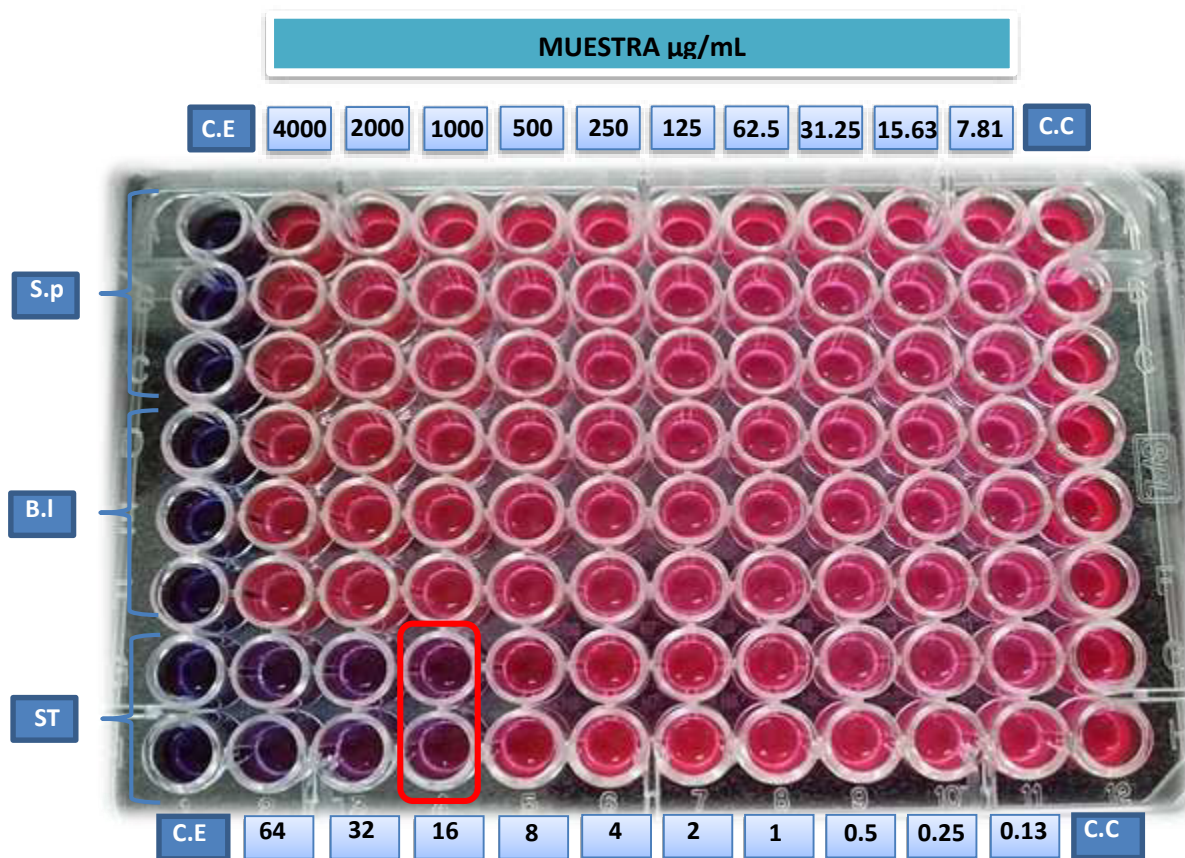
En las figuras del 37 al 39 y en la tabla 30 se observa que tanto el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* y el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* presentan una CMI > 4000  $\mu\text{g/mL}$  contra *Escherichia coli* ATCC 8731, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* ATCC 10231.



**Figura 35.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Schkuhria pinnata* (S.p), *Baccharis latifolia* (B.I) y estándar de eritromicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.

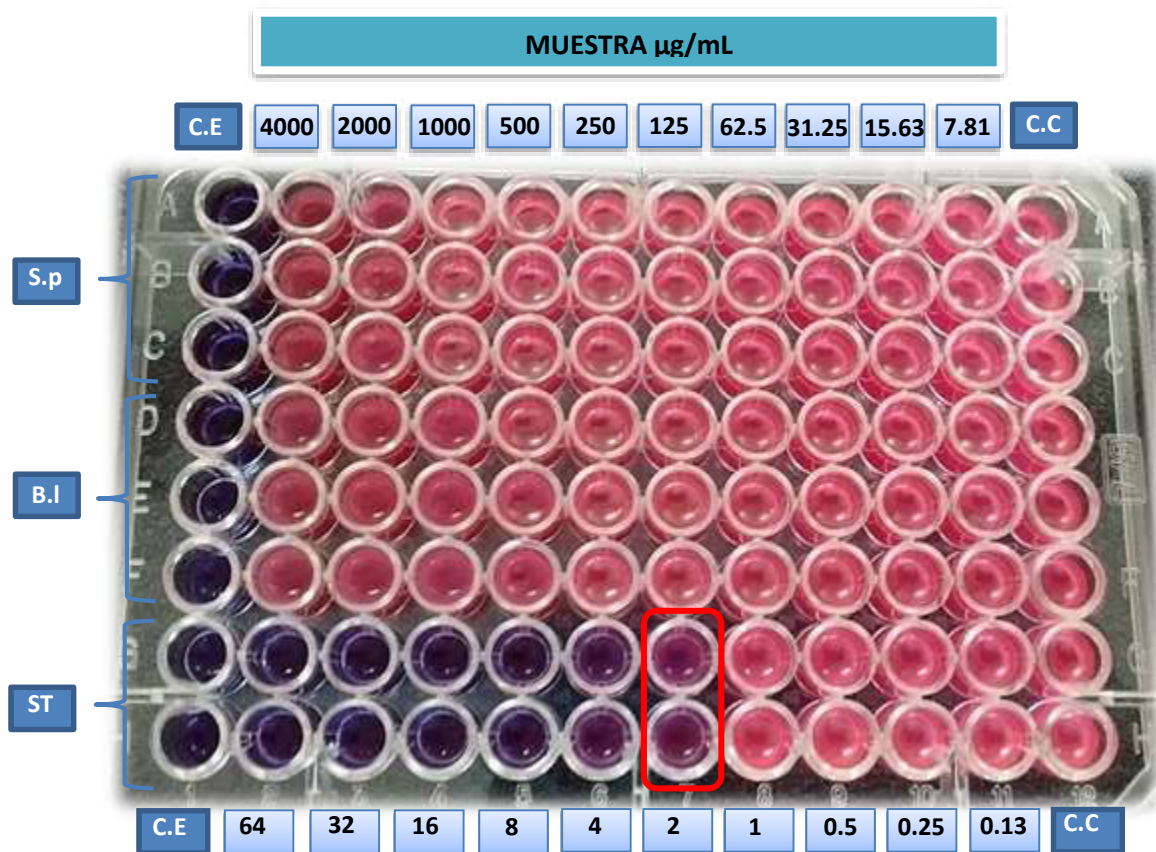


**Figura 36.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Schkuhria pinnata* (S.p), *Baccharis latifolia* (B.I) y estándar de eritromicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.

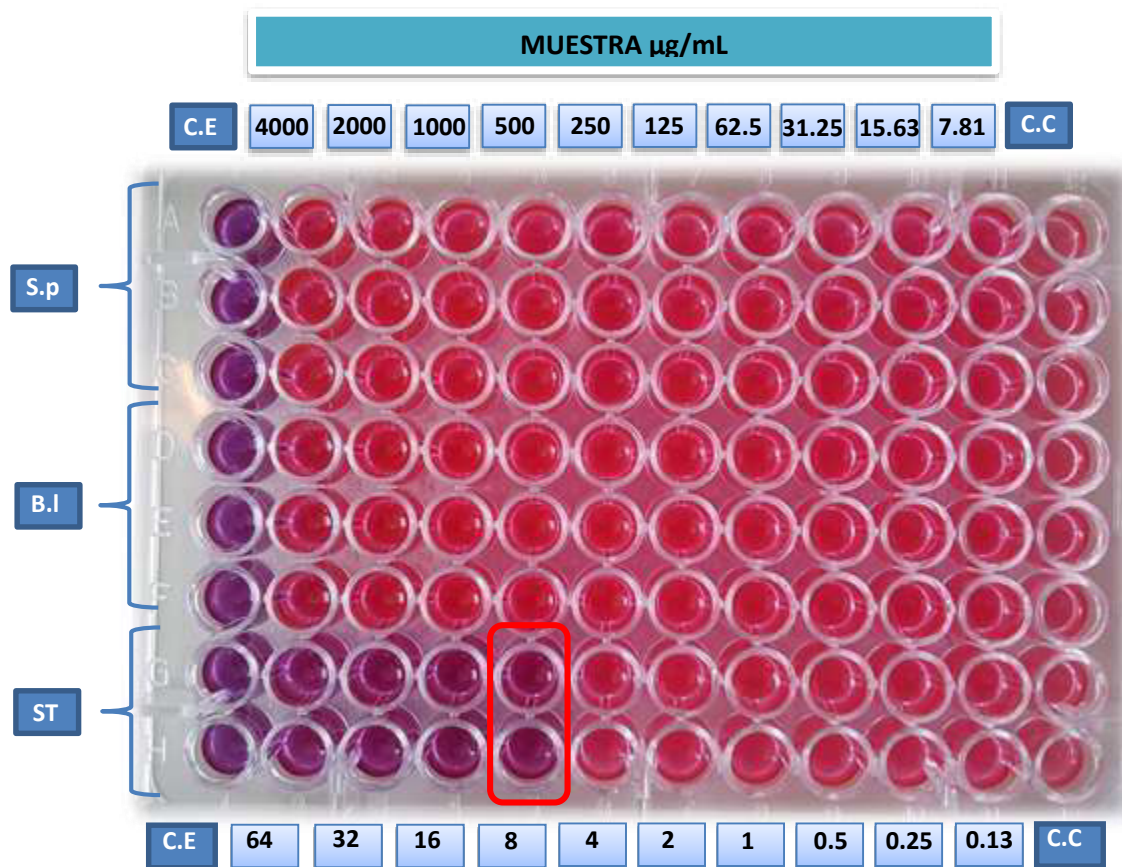


**Figura 37.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Schkuhria pinnata* (S.p), *Baccharis latifolia* (B.l) y estándar de gentamicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a *Escherichia coli* ATCC 8731, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.





**Figura 38.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Schkuhria pinnata* (S.p), *Baccharis latifolia* (B.l) y estándar de gentamicina (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.

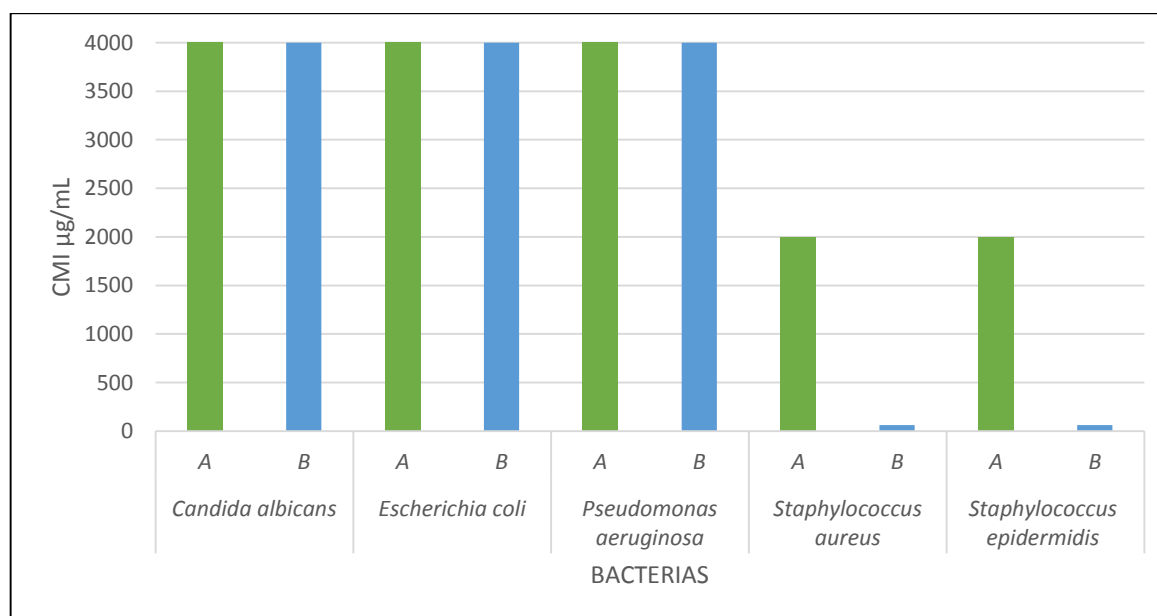


**Figura 39.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Schkuhria pinnata* (S.p), *Baccharis latifolia* (B.l) y estándar de fluconazol (ST) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a *Candida albicans* ATCC 10231, donde C.E. es control de esterilidad y C.C. es control de crecimiento.

**Tabla 30.** Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia* contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

Muestra problema	Concentración mínima inhibitoria (CMI)				
	Bacterias GRAM (+)		Bacterias GRAM (-)		Hongo
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	<i>E. coli</i> ATCC 8731	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
<i>Schkuhria pinnata</i>	2000 ± 0 µg/mL	2000 ± 0 µg/mL	> 4000 µg/mL	> 4000 µg/mL	> 4000 µg/mL
<i>Baccharis latifolia</i>	62.5 ± 0 µg/mL	62.5 ± 0 µg/mL	> 4000 µg/mL	> 4000 µg/mL	> 4000 µg/mL
Eritromicina	0.25 ± 0 µg/mL	< 0.125 µg/mL	-	-	-
Gentamicina	-	-	16 ± 0 µg/mL	2 ± 0 µg/mL	-
Fluconazol	-	-	-	-	8 ± 0 µg/mL

Leyenda: Los resultados se expresan en promedios ± D.E.



**Figura 40.** Comparación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Schkuhria pinnata* (A) y *Baccharis latifolia* (B) contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

## V. DISCUSIÓN

El screening fitoquímico de los extractos metanólico de *Schkuhria pinnata* e hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* evidenciaron la presencia de terpenos y compuestos polifenólicos (fenoles, flavonoides, lactonas y cumarinas), de los cuales el extracto de *Baccharis latifolia* presentó adicionalmente antraquinonas; así como se evidenció la presencia de saponinas triterpenoides en el extracto de *Schkuhria pinnata*. Este resultado obtenido tiene concordancia con los reportes de composición general de la familia *Asteraceae* reportado por Del Vltto<sup>8</sup> (2009), así como trabajos previos del género *Baccharis*<sup>19, 23, 45</sup> y *Schkuhria*<sup>117, 118</sup>, pero no con intensidad suficiente para la extracción de triterpenos en *Baccharis latifolia* debido a la polaridad del solvente y técnica de extracción empleados, ya que se encuentran en mayor proporción en el aceite obtenido por el método de hidrodestilación<sup>17, 119</sup>.

Se utilizaron agua, etanol y metanol como solventes principales en la extracción por método de maceración debido a que los metabolitos secundarios de interés, entre ellos los compuestos fenólicos (uno de los principales responsables de la actividad antioxidante gracias a su habilidad de gran barrido de radicales libres, donación de hidrógeno y eficientes quelantes de metales)<sup>108</sup>, son afines a solventes de bajas polaridades; además, éstos en su gran mayoría se encuentran como compuestos glicosidados en especies vegetales, lo que hace posible su extracción en medios hidrofílicos<sup>74,120,121</sup>. A los terpenos también se les atribuye actividad antioxidante<sup>122</sup>, en tanto que la actividad antimicrobiana, citotóxica y repelente, está atribuida también a la presencia de terpenos, triterpenos, esteroides y antraquinonas<sup>71, 76, 122</sup>.

Respecto a la actividad antioxidante, las plantas en estudio fueron sometidas a tres pruebas que conjuntamente determinan la actividad anti-radical: cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, método del radical libre 2,2-difenil1-picrilhidrazilo DPPH y 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS<sup>+</sup>. El ensayo preliminar fue el de cuantificación de polifenoles totales, el cual demostró que en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* se obtuvo 9.98 mg de ácido gálico equivalente a un miligramo de muestra, casi el doble del obtenido en el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* (4.82 mg de ácido gálico equivalente a un

miligramo de muestra). Este resultado se vio reflejado también en los datos obtenidos de IC<sub>50</sub> por los métodos anti-radical DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, teniéndose un valor bajo en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* (IC<sub>50</sub> = 64,70 µg/mL por método DPPH y 501,09 µg/mL por método ABTS<sup>•+</sup>) y un valor alto de actividad equivalente a trolox (un polifenol hidrosoluble análogo a la vitamina E) o TEAC (0.17 µg trolox/µg muestra por método DPPH y 0,13 µg trolox/µg muestra por método ABTS<sup>•+</sup>) en comparación al extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* (IC<sub>50</sub> = 223,98 µg/mL por método DPPH y 842,07 µg/mL por método ABTS<sup>•+</sup>).

Contrastando los resultados obtenidos con los reportados por Prada<sup>45</sup> (2015) para el IC<sub>50</sub> por método del radical DPPH del extracto hidroalcohólico de hojas de 19 ejemplares de *Baccharis latifolia* en Colombia, se observa que son ligeramente mayores a los obtenidos en el presente trabajo, así como valores menores de polifenoles totales. Otro trabajo realizado en Sudáfrica por Beseni *et al.*<sup>127</sup> (2019) con el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* reveló gran cantidad de polifenoles equivalente a ácido tánico y pobre en flavonoides equivalente a quercetina; sin embargo, el IC<sub>50</sub> obtenido por método anti-radical DPPH fue mucho mayor al obtenido en el presente trabajo (IC<sub>50</sub> = 10,32 mg/mL), ello puede atribuirse a la diferencia de composición de metabolitos secundarios que contribuyen a la actividad anti-radical, así como variables ambientales, condiciones climáticas<sup>125</sup> y ciertos mecanismos y factores descritos a continuación.

La diferencia de la capacidad de declive de la absorbancia entre una muestra y otra puede deberse a diferentes razones, desde la cantidad y/o tipo de polifenoles, los mecanismos involucrados en la reacción entre la molécula antioxidante y los radicales, la estequiometría de éstas reacciones, el potencial de reducción de un electrón de los radicales con respecto al extracto, la estereoselectividad o accesibilidad al centro radical (como por ejemplo en la molécula del DPPH), etc<sup>108,124</sup>. Además, la actividad antioxidante depende en gran medida de la metodología usada y las condiciones de reacción como la polaridad del medio disolvente, pH y temperatura. De ahí la importancia de la descripción detallada de la metodología y los parámetros de influencia para poder comparar los resultados obtenidos con resultados de otros



estudios similares. El tipo de medio disolvente empleado es responsable de la transferencia del electrón y/o átomo de hidrógeno entre los compuestos antioxidantes, se describe que el medio acuoso es el que mejor soporta la desprotonación del fenol como es usado en el método ABTS y tiene mayor capacidad de aceptación de enlaces hidrógeno que en medio con metanol usado en el método DPPH<sup>126</sup>.

Por otro lado, el método ABTS brinda ventajas respecto al método DPPH, como su solubilidad en agua y su alto coeficiente de absorción en longitudes de onda larga, lo que permite evaluar la absorbancia en el tiempo con mínimas interferencias. Además, el método ABTS se puede usar a diferentes niveles de pH simulando medios biológicos, lo que hace que los resultados obtenidos tengan mayor relevancia cuando se plantee el estudio de actividad antioxidante in vivo<sup>123</sup>.

Respecto a la actividad antimicrobiana, se evaluaron ambos extractos contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8731, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y *Candida albicans* ATCC 10231. El extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* presentó una CMI de 2000 µg/mL contra *S. aureus* y *S. epidermidis*. Éste resultado se asemeja al obtenido por Kudumela y Masoko<sup>128</sup> (2018), quienes evaluaron la actividad antibacteriana de las hojas de 4 plantas (de *Schkuhria pinnata* tomaron toda la planta, salvo las raíces) mediante el método de microdilución desarrollado por Eloff, obteniendo una CMI de 2.5 mg/mL contra *S. aureus*. En ambos casos, la CMI del extracto es muy superior a la del estándar del antibiótico con el que se trabajó. De igual modo, en otro estudio realizado en Zimbabwe<sup>12</sup>, se encontró que, si bien tanto el extracto acuoso como metanólico de *Schkuhria pinnata* presentaron actividad contra *S. aureus*, era mucho menor al estándar del antibiótico con el que trabajaron. Por otra parte, Suliman<sup>129</sup> reportó una CMI de 0.75 mg/mL del extracto de hojas de *Schkuhria pinnata* disuelto en acetona contra *S. auerus*, lo cual indica que tiene buena actividad antibacteriana. Cabe resaltar que Bussamnn R, *et al.* (2008)<sup>130</sup> determinaron mediante bioensayos que los extractos etanólicos de *Schkuhria pinnata* y otras plantas estudiadas tienen notable actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

El extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* presentó una CMI mayor a 4000 µg/mL contra *E. coli* y *P. aeruginosa* indicando una actividad antimicrobiana no significativa. Estos resultados se condicen con lo encontrado en la literatura consultada. Por ejemplo, Wagate *et al.*<sup>131</sup> (2010) estudiaron 11 plantas medicinales en Kenya (entre las cuales estaba *Schkuhria pinnata*), a partir de las cuales se obtuvieron extractos metanólicos que, por medio del método de dilución en caldo, determinaron su CMI contra cepas bacterianas de referencia (entre las que figuraban *E. coli* y *P. aeruginosa*, encontrándose que ambas bacterias mencionadas no mostraron sensibilidad al extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*. De igual forma, Zampini IC *et al.*<sup>132</sup> (2007) determinaron mediante el método de difusión en agar que el extracto de *Schkuhria pinnata* no mostró actividad contra *E. coli* ni *P. aeruginosa*. Continuando, Mupfure A *et al.*<sup>12</sup> (2017) determinaron que *Schkuhria pinnata* tenía actividad contra *E. coli* a altas concentraciones (trabajaron con concentraciones de 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 % v/v). Por último, Luseba D *et al.*<sup>13</sup> (2007), determinaron que el extracto metanólico al 90 % de los brotes de *Schkuhria pinnata* resultaron ser activos contra *S. aureus* y *E. coli*, mas no contra *P. aeruginosa*.

Pasando a los resultados de la actividad antifúngica del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*, éste presentó una CMI mayor a 4000 µg/mL contra *Candida albicans*. Esto se corrobora con lo reportado por A. Gette M *et al.*<sup>133</sup> (2007), quienes mediante el método de microdilución en caldo hallaron que el extracto metanólico de las partes aéreas de *Schkuhria pinnata* tiene una CMI mayor a 1000 µg/mL, concluyendo que no tiene actividad antifúngica. Esto último se confirma con lo reportado por Suliman A<sup>129</sup> (2010), quien determinó mediante la técnica de microdilución que el extracto de acetona de hojas de *Schkuhria pinnata* tenía una CMI de 4 mg/mL, significando una moderada actividad antifúngica.

Por otro lado, el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* fue evaluado del mismo modo contras las cepas anteriormente mencionadas, obteniendo resultados similares. Así, tenemos que contra *S. aureus* y *S. epidermidis*, el extracto tuvo una CMI de 62.5 µg/mL, una cifra relativamente cercana a la del estándar del antibiótico usado (eritromicina). Esta cifra indica que tiene buena actividad contra las dos cepas

evaluadas, lo cual se condice con lo reportado por Sequeda-Castañeda LG *et al.*<sup>57</sup> (2015), quienes hacen una compilación de información concerniente a su taxonomía, etnobotánica, fitoquímica, toxicidad y actividades biológicas, señalando que sus aceites esenciales mostraron una interesante actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. También Abad y Bermejo<sup>19</sup> (2007) consignan lo indicado anteriormente en su compilado de información sobre las más recientes investigaciones en etnofarmacología, farmacología y fitoquímica del género, añadiendo que los terpenoides, principales componentes de los aceites esenciales, son los componentes responsables de la actividad antimicrobiana reportada en las especies de *Baccharis*. Si bien Rodríguez Estéfano PE<sup>55</sup> (2016) reportó que el extracto de *Baccharis latifolia* no mostró actividad contra *S. aureus* a las concentraciones trabajadas (entre 7.81 y 1000 µg/mL) tras partir de una concentración inicial de 20 mg/mL de extracto en dimetilsulfóxido (DMSO), no descarta su actividad empleando otros sistemas de evaluación de actividad *in vitro*.

Prosiguiendo, tenemos que al evaluarlo contra *E. coli* y *P. aeruginosa*, tuvo como resultado en ambos casos una CMI mayor a 4000 µg/mL. Ello confirma lo reportado por la literatura consultada. Sequeda-Castañeda *et al.*<sup>57</sup> (2015) mencionan en su información compilada que los aceites esenciales de *B. latifolia* no fueron activos contra *E. coli* ni *P. aeruginosa*. Del mismo modo, Rodríguez Estéfano PE<sup>55</sup> (2016) reportó que el extracto de *B. latifolia* no mostró actividad contra *E. coli* ni *P. aeruginosa*. Sumado a ello, García Ibarra VA (2007)<sup>135</sup> encontró que el extracto de *Baccharis latifolia* empezó a mostrar actividad antibacteriana contra *E. coli* y *P. aeruginosa* a concentraciones mayores a 5 mg/mL.

La presencia de metabolitos secundarios como terpenoides y compuestos fenólicos como los flavonoides puede explicar las propiedades antimicrobianas de los extractos. Sin embargo, observamos que los extractos tuvieron actividad contra bacterias gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*), pero no contra las gram-negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*). Según Kudumela y Masoko<sup>128</sup> (2008), la diferente sensibilidad de los extractos trabajados (entre los que estaba el de *Schkuhria pinnata*) se atribuye a la diferencia en la morfología de la membrana celular. Respecto a ello, Martínez Tapia

HS<sup>51</sup> (2010) señala que las bacterias gram-negativas son por lo general las menos susceptibles debido a su membrana externa con superficie hidrofílica, esto gracias a moléculas de lipopolisacáridos presentes que actúan como barrera de penetración de macromoléculas y compuestos hidrofóbicos; por lo que pueden ofrecer resistencia a compuestos y antibióticos hidrofóbicos. Lo reportado por Sequeda-Castañeda LG *et al.*<sup>57</sup> (2015) confirma lo anterior: los aceites esenciales (compuestos caracterizados por su hidrofobicidad) de *Baccharis latifolia* mostraron actividad contra *S. aureus* (bacteria gram-positiva), pero no contra *E. coli* ni *P. aeruginosa* (bacterias gram-negativas). Si bien se han identificado numerosos aceites esenciales (limoneno principalmente, sabineno, sesquiterpenos como  $\alpha$ -tujeno, germacreno, entre otros)<sup>21, 57</sup>, su mecanismo de acción no está totalmente claro<sup>134</sup>, proponiéndose como una forma su interferencia en el metabolismo celular al penetrar a través de las membranas bacterianas e interrumpir sus propiedades funcionales.

Por último, respecto a su actividad antifúngica, se evaluaron los extractos contra *C. albicans*, presentándose como resultado una CMI mayor a 4000  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual se corrobora con lo encontrado por García Ibarra VA<sup>135</sup> (2007), quien reportó que el extracto etanólico de *Baccharis latifolia* inhibió ligeramente la cepa mencionada a una concentración de 10 mg/mL. Asimismo, Marín Ocampo AM *et al.*<sup>136</sup> (2006) indicaron en los resultados de su investigación que el extracto acuoso de *Baccharis latifolia* no mostró actividad contra *C. albicans* a una concentración de 512 mg/mL, aunque es necesario señalar que mencionan la posibilidad que el extracto hidroalcohólico tenga más actividad que el acuoso (esto al comparar sus resultados en *Baccharis trinervis* con los de otro trabajo), pero que se necesitan estudios posteriores para corroborar ello. En contraste, Martínez S *et al.*<sup>137</sup> (2011) sí encontraron actividad inhibitoria de *Baccharis latifolia* contra *C. albicans*, pero de sus extractos polares etanólicos.

## VI. CONCLUSIONES

- La marcha fitoquímica reveló que tanto el extracto de *Schkuhria pinnata* y el extracto de *Baccharis latifolia*. presentaron fenoles, lactonas/cumarinas, taninos y flavonoides; en contraste, se encontraron saponinas triterpenoides en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*, y naftoquinonas-antraquinonas en el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*.
- La determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu tuvo como resultado una mayor cantidad en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* (9.9818 mg de ácido gálico equivalente a 1 mg de muestra) que en el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* (4.8213 mg de ácido gálico equivalente a 1 mg de muestra).
- La evaluación de la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS<sup>•+</sup> dieron como resultado una mayor actividad antioxidante en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* al tener menor IC<sub>50</sub> y mayor TEAC respecto al extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* tanto en DPPH (IC<sub>50</sub>: 64.70 µg/mL contra 223.98 µg/mL respectivamente, TEAC: 0.17 µg trolox/µg de muestra contra 0.05 µg trolox/µg de muestra respectivamente) como en ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub>: 501.09 µg/mL contra 842.07 µg/mL respectivamente, TEAC: 0.13 µg trolox/µg de muestra contra 0.08 µg trolox/µg de muestra respectivamente), observándose diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.000$ ) con un  $\alpha < 0.05$ .
- La evaluación de la actividad antimicrobiana dio como resultado, para el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*, buena actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228, y actividad no significativa contra *E. coli* ATCC 8731, *P. aeruginosa* ATCC 27853, y *C. albicans* ATCC 10231; y para el extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*, actividad no significativa contra las cepas ensayadas.

- Al comparar los extractos con los antibióticos de referencia, se observa que solo el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* tuvo una CMI relativamente cercana (62.5 µg/mL) al del antibiótico de referencia (estándar de eritromicina: 0.25 µg/mL) al evaluarlo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## VII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere continuar los estudios de actividad antioxidante y antibacteriana con los extractos de *Baccharis latifolia* y *Schukuhria pinnata* purificados ya que se han encontrado buena actividad antioxidante, así como buena respuesta antibacteriana de *Baccharis latifolia* frente a cepas gram positivas; además de aislar y elucidar las estructuras de los metabolitos responsables de dichas actividades. Se sugiere, además, poder detallar los mecanismos de reacción involucrados entre los metabolitos secundarios y las respuestas antioxidante y antibacteriana.
- Si bien los métodos de actividad antioxidante *in vitro* DPPH y ABTS seguirán siendo herramientas útiles para una evaluación rápida de las especies antioxidantes dentro de muestras complejas, es necesario llevar a cabo el estudio antioxidante *in vivo* para poder esclarecer su actividad real, ya que la actividad antioxidante implica diferentes reacciones del proceso de oxidación.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palacios E. Economía y plantas medicinales. *Pensamiento Crítico*. 2004; 3: 12-23.
2. Bussmann R, Sharon D. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía: La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú. Lima: GRAFICART SRL; 2015.
3. Congreso de la República del Perú. Ley de protección al acceso a la diversidad biológica peruana y a los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas. Publicado en el diario oficial El Peruano, N° 8714, Ley N° 28216, (1 de mayo de 2004).
4. Congreso de la República del Perú. Ley que establece el régimen de protección de los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas vinculados a los recursos biológicos. Publicado en el diario oficial El Peruano, N° 8085, Ley N° 27811, (10 de agosto de 2002).
5. Congreso de la República del Perú. Ley de aprovechamiento sostenible de las plantas medicinales. Publicado en el diario oficial El Peruano, N° 7320, Ley N° 27300, (8 de julio de 2000).
6. MINSA. Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud. Publicado en el diario oficial El Peruano, N° 8238, Decreto Supremo N° 001-2003-SA, (11 de enero de 2003).
7. Gonzaga L, Costa M, Pizzolatti M. Género *Baccharis* (*Asteraceae*): aspectos químicos, económicos e biológicos. *Quím Nova*. 2005; 28(1): 85-95.
8. Del Vitto L, Petenatti E. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*. 2009; 18 (2): 87-115.
9. Kareru PG, Kenji GM, Gachanja AN, Keriko JM, Mungai G. Traditional medicines among the Embu and Mbeere peoples of Kenya. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2006; 4(1):75-86.
10. Tropical Plant Database File for: Canchalagua - *Schkuhria pinnata* [Internet] 1996 [acceso 10 de enero del 2018]; Disponible en: <http://www.rain-tree.com/canchalagua.htm#.WHZtLIPhDcs>

11. Kimani NM, Matasyoh JC, Kaiser M, Brun R, Schmidt TJ. Antiprotozoal Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from *Tarchonanthus camphoratus* and *Schkuhria pinnata*. J Nat Prod. 2018; 81(1):124-130.
12. Mupfure A, Matondi GHM, Imbayarwo–Chikosi V, Nyamushamba GB, Marandure T, Masama E. Potential use of *Schkuhria pinnata* in the Control of Mastitis Pathogen. Int J Innov Res Develop. 2017; 11 (3): 415 - 120.
13. Luseba D, Elgorashi E, Ntloedibe D, Van Staden J. Antibacterial, Anti-inflammatory and mutagenic effects of some medicinal plants used in South Africa for the treatment of wounds and retained placenta in livestock. S African J Bot. 2007; 73: 378-383.
14. McGaw L, Van der Merwe D, Eloff J. In Vitro Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxic Effects of Extracts from Plants Used in South African ethnoveterinary medicine. Vet J. 2007; 173(2): 366-372.
15. León A, Reyes BM, Chávez MI, Toscano RA, Delgado G. Sesquiterpene Lactones, Acyl Phenyl Propanoids and Other Constituents from *Schkuhria pinnata* var. *wislizeni*: Antioxidant Evaluation. J Mex Chem Soc. 2009; 53(3): 193-200.
16. Molares S, Gonzáles SB, Ladio A, Agueda M. Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn. (Asteraceae: Astereae). Acta Bot Bras. 2009; 23(2): 578-589.
17. Prada J, Orduz-Díaz L, Coy-Barrera E. Baccharis latifolia: Una Asteraceae poco valorada con potencialidad química y medicinal en el neotrópico. Revista Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Militar Nueva Granada. 2016; 12 (1): 92-105.
18. López JA. Herbolaria Apuntes. Toluca de Lerdo: Universidad Autónoma del Estado de México; 2016.
19. Abad MJ, Bermejo P. *Baccharis (Compositae)*: a review update. ARKIVOC. 2007; 7: 76-96.
20. Carrizo R, Ponzi M, Ardanaz C, Tonn CE, Donadel OJ. Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavon) Pers. and antibacterial activity. J Chil Chem Soc. 2009; 54(4): 475-476.



21. Enríquez S. Concentración de flavonoides en la masa foliar de chilca (*Baccharis latifolia*) a 3 niveles altitudinales en época de transición (húmeda-seca) Lluto-La Paz [Tesis]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2016.
22. Onofre SB, Canton M, Pires PA. Action of Essential Oils Obtained from *Baccharis coridifolia* D.C. (Asteraceae-Astereae) on the Activity of Antibiotics. Sci Res. 2013; 3: 166-170.
23. Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola LA. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of northern Chile. Molecules, 2008; 13: 790-794.
24. Infante R. Comparación de la genotoxicidad in vitro de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntse "Canchalagua" frente a ADN genómicos de: Humano, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis]. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2015.
25. Wang Z, Hwang SH, Guillen Quispe YN, Gonzales Arce PH, Lim SS. Investigation of the antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of extracts from Peruvian tea plant infusions. Food Chem. 2017; 231:222-230.
26. Landa C. Estudio comparativo de plantas hepatoprotectoras de origen chino y peruano [Tesis]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2017.
27. Salazar W, Cárdenas J, Núñez M, Fernández I, Villegas L, Pacheco L, Untiveros G. Estudio fitoquímico y de la actividad antihelmíntica de los extractos de *Euphorbia huanchahana* y *Baccharis salicifolia*. Rev Soc Quim Perú. 2007; 73(3): 150-157.
28. Loja B, Alvarado A, Salazar A, Ramos E, Jurado B. Cribado fitoquímico del *Baccharis latifolia* (R&P.) Pers. (chilca). Rev Cubana Plant Med. 2017; 22(1): 1-7.
29. Aguilar E, Anaya B, Alarcón J, Tinco A. Etnobotánica, fitoquímica y farmacología de especies del género *Baccharis* (Asteraceas) utilizadas como plantas medicinales en el departamento de Ayacucho. Ciencia e Investigación. 2007; 10(1): 13-19.
30. Katinas L, Gutiérrez D, Grossi M, Crisci J. Panorama de la familia *Asteraceae* (Compositae) en la República Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 2017; 42 (1-2): 113-129.

31. Britto B, Arana C. Corotipos preliminares de Perú basados en la distribución de la familia *Asteraceae*. *Darwiniana*, Nueva Serie 2014; 2 (1): 39-56.
32. Beltrán H. Las Asteráceas (Compositae) del distrito de Laraos (Yauyos, Lima, Perú). *Revista Peruana de Biología* 2016; 23 (2): 195-220.
33. Muñoz-Schick M, Moreira-Muñoz A, Moreira S. Origen del nombre de los géneros de plantas vasculares nativas de Chile y su representatividad en Chile y el mundo. *Gayana Bot.* 2012; 69 (2): 309-359.
34. The Plant List [Internet]. The Plant List; 2010 [actualizado setiembre 2013; citado octubre 2018]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/>
35. Novara L, Petenatti E. Flora del Valle de Lerma. Vol 4. Argentina: Herbario MCNS Facultad de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Salta; 2012.
36. Molinelli M, Planchuelo A. Farmoplasmas, Canchalagua *Schkuhria pinnata*. *BIFASE* 2017; 30 (1): 56-70.
37. Duke J. Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America. Vol 1. 1ra Edición. Boca Raton, Florida: Editorial Taylor & Francis Group (CRC Press); 2008.
38. Molinelli M, Perissé P, Fuentes E, Planchuelo A. Calidad botánica de drogas crudas comercializadas como "canchalagua" en Córdoba, Argentina. *Bol Soc Argent Bot.* 2014; 49 (2): 293-316.
39. Herbario Rapid Reference [Internet]. Plantidtools Field Museum; 2017. [actualizado enero 2017; citado octubre 2018]. Disponible en: <https://plantidtools.fieldmuseum.org/>
40. Alonso J, Desmarchelier C. Plantas medicinales autoctonas de la Argentina, Bases Científicas para su Aplicación en Atención Primaria de la Salud. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus Editorial y Distribuidora; 2015.
41. Heiser C. A revision of the genus *Schkuhria*. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 1945; 32 (3): 265-278.
42. León M. Aislamiento y Determinación de la estructura molecular de algunos metabolitos secundarios de las partes aéreas de *Schkuhria pinnata*. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
43. Giuliano DA. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (*Asteraceae*, *Astereae*). *Darwiniana*, Nueva Serie. 2001; 39 (1-2): 131-154.

44. Rubio Taipe PN. Diseño y elaboración de un lipo gel antiinflamatorio de *Baccharis teindalensis* Kunt. (chilca) [Tesis doctoral]. Quito: Carrera de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador; 2013.
45. Prada Muñoz JM. Análisis metabolómico de la especie *Baccharis latifolia* (Asteraceae) en la sabana de Bogotá [Trabajo de Grado]. Bogotá: Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología Biorgánica, Universidad Militar Nueva Granada; 2015.
46. Heiden G, Pirani JR. A synopsis and notes for *Baccharis* subgen. *Tarchonanthoides* (Asteraceae: Astereae). Phytotaxa. 2012; 60: 41-49.
47. Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG. Género *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, económicos e biológicos. Química Nova. 2005; 28 (1): 85-94.
48. Birrel E. Fraccionamiento bioquímico de *Baccharis trimera* en búsqueda de agentes anti-*T. cruzi* [Tesina de Grado]. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República; 2013.
49. Valtierra V, Bonifacino JM. Revisión taxonómica de *Baccharis* sect. *Heterothalamus* (Asteraceae: Astereae) en Uruguay. Bol Soc Argent Bot. 2014; 49 (4): 613-620.
50. Hoyos Vargas KM, Yep Chu MY. Diseño de una formulación de aplicación tópica a base de *Baccharis latifolia* (Chilca), con efecto antiinflamatorio [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: E.A.P. de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
51. Martínez Tapia HS. Estudio in vitro de la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* (Carrera de Ciencias Químicas) sobre Microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos (Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas), en el año 2010 [Tesis]. La Paz: Carrera de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Mayor de San Andrés; 2010.
52. Rodriguez MV, Gattuso SJ, Gattuso MA. Micrographic standarization of *Baccharis* L. species (Asteraceae). Dominguezia. 2013; 29 (1): 39-54.

53. Moreta Villacres RF. Aplicación de modelos matemáticos para la cuantificación y logística de la biomasa disponible en chilca (*Baccharis latifolia*) [Trabajo de investigación para optar el título de Ingeniero Agrónomo]. Ambato: Carrera de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato; 2014.
54. Fernández Cañar DS. Estudio de la acción hipoglucemiante y desinflamatoria de la chilca (*Baccharis latifolia*) en la provincia de El Oro-2013 [Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica]. Machala: Carrera de Bioquímica y Farmacia, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala; 2014.
55. Rodríguez Estéfano, PE. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios aislados de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia* [Trabajo de Titulación]. Loja: Área Biológica, Universidad Técnica Particular de Loja; 2016.
56. Cacasaca Avila RM. Industrialización de chilca (*Baccharis latifolia*) en el municipio de La Paz [Proyecto de Grado]. La Paz: Carrera de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Mayor de San Andrés; 2012.
57. Sequeda-Castañeda LG, Célis C, Luengas-Caicedo PE. Phytochemical and therapeutic use of *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae). PharmacologyOnLine. 2015; 2: 14-17.
58. Bruneton J. Fitoquímica Plantas Medicinales. 2da Edición. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 1993.
59. Estrada Beltrán LA. Síntesis de Pomiferín G: un diterpenoide tipo abietano aislado de *Salvia pomífera* [Proyecto de Grado]. Sartenejas: Coordinación de Licenciatura en Química, Decanato de Estudios Profesionales, Universidad Simón Bolívar; 2005.
60. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2009; 2 (3): 119-145.
61. Carreras N, Miguel M, Aleixandre A. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Nutr Clin Diet Hosp. 2012; 32 (3): 81-91.

62. León P, Guevara-García A. La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano. *Mensaje Bioquímico*. 2007; 31: 77-90.
63. Alcántar Aguirre FC. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) [Tesis de Grado]. Irapuato, Guanajuato: Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2005.
64. Grzona LM. Isomerización de  $\alpha$ -pineno sobre heteropolicompuestos [Tesis doctoral]. La Plata: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata; 2015.
65. Franco Rodríguez VH. Desarrollo de una estrategia de enseñanza que promueva actitudes favorables hacia la química desde el enfoque de ciencia, tecnología, sociedad y ambiente y el estudio del compuesto  $\alpha$ -pineno [Tesis para optar al grado de Magíster en Enseñanza de las Ciencias Exactas y Naturales]. Bogotá: Facultad de Ciencias, Maestría en enseñanza de las ciencias exactas y naturales, Universidad Nacional de Colombia; 2012.
66. Vásquez-Luna A, Pérez-Flores L, Díaz-Sobac R. Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007; 5 (4): 306-313.
67. Rosas Mamani VR. Cinética de extracción del aceite esencial del kjento kjento (*Rumex Crispus L.*) [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Químico]. Puno: Escuela Profesional de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Altiplano; 2015.
68. Ringuelet J, Viña S. *Productos Naturales Vegetales*. 1ra edición. La Plata: Universidad Nacional de La Plata; 2013.
69. Cano-Flores, A. Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Internet]. 2013; 44 (2): 7-16.

70. Camacho Huerta MZ. Caracterización estructural de metabolitos secundarios de *Capparis ovalifolia* [Tesis para optar el título de Licenciado en Química]. Lima: Facultad de Ciencias e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú; 2012.
71. Hernández-Ocura L, De La Cruz-Galicia MG, González-Zavala MA, Terrazas-Flores JJ, López-López LII, Silva-Belmares SY. Potencial Farmacológico de Triterpenos Presentes en Fracciones Sólido-Líquido de *Euphorbia hyssopifolia* L. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2014; 6 (11): 22-27.
72. Barberán T. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, Nutrición y Salud. 2003; 10 (2): 41-53.
73. Quiñonez M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr. Hosp. 2012; 27 (1): 76-89.
74. Peñarrieta M, Tejada L, Mollinedo P, Vila J. Bravo J. Compuestos fenólicos en la comida. Revista Boliviana de Química. 2014; 31 (3): 68-81.
75. Correia Pinto Carvalho de Matos M. Cumarinas: Versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica [Tesis]. Brasil, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Farmacia; 2014.
76. Teixeira E, Lopes W, De Andrade J. Fuentes, formación, reactividad y determinación de quinonas en la atmosfera. Quim. Nova. 2016; 39 (4): 486-495.
77. Leyva E, Loredó-Carrillo S, López L, Escovedo-Avellaneda E, Navarro-Tovar G. Importancia química y biológica de naftoquinonas. Afinidad LXXIV. 2017; 577: 36-50.
78. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev. Fac. Med. UNAM. 2009; 52 (2): 73-75.
79. López T. Flavonoides. OFFARM. 2002; 24 (4): 108-113.
80. Poggio M. Consumo de antioxidantes naturales en personas con dislipidemia [Tesis de Grado]. Rosario: Universidad Abierta Interamericana; 2012.
81. Oliveira Bardales G. Capacidad antioxidante de *Averrhoa carambola* L. (carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres [Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Nutrición con mención en Aspectos Biológicos]

- de la Nutrición]. Lima: Unidad de Posgrado, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
82. Palafox-Vigil G, García-Esquivel MA, Galván-Martínez S. Antioxidantes y pelo. *Dermatol Rev Mex*. 2015; 59 (5): 421-429.
83. HSN Blog [Internet]. N.d. Antioxidantes [Consultado el 17 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.hsnstore.com/blog/antioxidantes/>
84. Zapata LM, Gerard L, Davies C, Schvab M. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia, Docencia y Tecnología*. 2007; 35: 175-193.
85. Coronado M, Vega y León S, Gutiérrez R, Vásquez M, Radilla C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*. 2015; 42 (2): 206-212.
86. Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera G, Sumaya Martínez MT. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 2010; 50: 10-15.
87. Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*. 2013; 20 (3): 161-168.
88. Mácula-Retina [Internet]. Última actualización el 15 de marzo de 2016. Estrés oxidativo y retraso del envejecimiento [Consultado el 17 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.macula-retina.es/estres-oxidativo-y-retraso-del-envejecimiento/>
89. Flores Palacios K, Puente Puente MR. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” sobre *Escherichia coli* [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Huancayo: Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Los Andes; 2016.
90. Garcia Silva DC. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género *Amaranthus* aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo diciembre de 2013-mayo de 2014 [Tesina de Grado]. Riobamba: Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo; 2015.

91. Chicaiza Curipallo GA. Determinación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos obtenidos de plantas de quinua (*Chenopodium quinoa willd*) aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo diciembre de 2013-mayo de 2014 [Tesina de Grado]. Riobamba: Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo; 2014.
92. Velásquez Villafuerte DB. Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora kunth* “chinche”. Lima: E.A.P. de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
93. Donis JH. Tipos de diseño de los estudios clínicos y epidemiológicos. *Avan Biomed*. 2013; 2(2): 76-99.
94. Cárdenas C. Actividad Antimicrobiana y Antioxidante del Extracto Etanólico de *Prosopis pallida* “algarrobo”. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017
95. United States Pharmacopoeia - National Formulary [USP 40-NF 35]. Volume 1. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2016. [791] pH; p. 595-599.
96. United States Pharmacopoeia - National Formulary [USP 40-NF 35]. Volume 1. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2016. General Notices and Requirements; p. 3-13.
97. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en estudios de productos naturales. 2a Edición. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima; 1994: 8-10.
98. Sánchez V. Obtención de un Extracto Acuoso con Propiedad Hipoglucemiante a Partir de las Semillas de Achiote (*Bixa orellana Linn*) Para el Tratamiento de la Diabetes, Machala 2014. [Tesis] Machala: Universidad Técnica de Machala; 2015.
99. ISO 14502-1: Contenido de polifenoles totales en té – Método colorimétrico usando reactivo Folin-Ciocalteu. International Organization for Standardization. Génova. 2005.



100. Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodriguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. Evaluación Fitoquímica Preliminar y Actividad Hipoglicemiante Aguda del Extracto Acuoso de la Raíz de *Ruellia tuberosa* L. en Ratas con Diabetes Experimental. *Revista Facultad de Farmacia* 2016; 79 (1, 2): 36 – 44.
101. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1995; 28: 25-30.
102. Murillo E, Lombo O, Tique M, Méndez JJ. Potencial antioxidante de *Bahuinia kalbreyeri* Harms (Fabaceae). *Inf Tecnol.* 2007; 18(6): 65-74.
103. Guija-Poma E, Inocente-Camones M, Ponce-Pardo J, Zarzosa-Norabuena E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med.* 2015; 15 (1): 57-60.
104. Pisoschi A, Cheregi M, Danet A. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules* 2009; 14: 480-493.
105. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc Tecnol Aliment.* 2005; 25(4): 726-732.
106. Payum T, Das AK, Shankar R, Tamuly C, Hazarika M. Antioxidant Potential of *Solanum spirale* Shoots and Berry: A Medicinal Food Plant Used in Arunachal Pradesh. *Am J PharmTech Res.* 2015; 5(4): 307-314.
107. Re R, Pellegrini N, Protteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26 (9-10): 1231-1237.
108. Mathew S., Abraham T. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44(2): 198–206.
109. Tovar J. Determinación de la Actividad Antioxidante por DPPH y ABTS de 30 Plantas Recolectadas en la Ecorregión Cafetera [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.

110. Foerster S, Desdilestro V, Hathaway L, Althaus C, Magnus U. A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 2017; 72(7): 1961-1968.
111. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-tenth edition. CLSI document M07-A10. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
112. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition. NCCLS document M27-A2. Pennsylvania: NCCLS; 2002.
113. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretative Breakpoints for Fluconazole and Candida Revisited: A Blueprint for the Future of Antifungal Susceptibility Testing. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2): 435-447.
114. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. Methods. 2007; 42(4): 325-329.
115. Ruiz J. Actividad Antifungica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis]. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
116. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th edition. CLSI supplement M100. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
117. Limaylla C, Lock O. Flavonoides en *Schkuhria pinnata* (Lam.) O. KTZE Var. *Pinnata*. Revista de Química. 1990; 4(2): 115-121.
118. Delgado G, Tejeda V. Acylated phenyl propanoids from *Schkuhria Schkuhrioides*. Nat Prod Lett 1998; 12(1): 17-22.
119. Valarezo E, Rosillo M, Cartuche L, Malagón O, Meneses M, Morocho V. Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. J Essent Oil Res. 2013; 25(3): 233-238.
120. Porras-Loaiza A.P., López-Malo A. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2009; 3(1): 121-134.

121. Robbins R.J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. J Agric Food Chem. 2003; 51(10): 2866–2887.
122. Menegotto C. Actividade Antimicrobiana e Antioxidante de Terpenoides [Tesis]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias Do Sul, 2010.
123. Shalaby E, Shanab S. Comparision of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potencial of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. Indian J Geomarine Sci. 2013; 42 (5): 556-564.
124. Campos AM, Lissi EA. Kinetics of the reaction between 2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. Int J Chem Kinet. 1997; 29(3): 219–224.
125. Brown D, Rashotte A, Murphy A, Normanly J, Tague B, Peer A, Taiz L, Muday G. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 2001; 126: 524– 535.
126. Abramovic H, Grobin B, Poklar N, Cigié B. The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potencial. Acta Chim Slov. 2017; 64: 491-499.
127. Beseni B, Matsebatlela T, Bagla V, Njanje I, Poopedi K, Mbazima V, Mampuru L, Mokgotho M. Potencial antiglycation and hypoglycaemic effects of *Toona ciliata* M. Roem. and *Schkuhria pinnata* Lam. Thell. crude extracts in differentiated C2C12 cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2019; 2019: 1-12. doi:10.1155/2019/5406862
128. Kudumela RG, Masoko P. In vitro assessment of selected medicinal plants used by the Bapedi community in South Africa for treatment of bacterial infections. J Evid Based Med. 2018; 23: 1-10.
129. Suliman A. The antimicrobial activity and chemical profile of traditional medicine plants indigenous to Southern Africa used to treat respiratory tract infections [Reporte de investigación para optar al grado de Masters of Science in Medicine]. Johannesburg: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Witwatersrand; 2010.
130. Bussmann R, Sharon D, Díaz D, Barocio Y. Peruvian plants canchalagua (*Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze), hercampuri (*Gentianella alborosea* (Gilg.)

- Fabris), and corpus way (*Gentianella bicolor* (Wedd.) J. Pringle) prove to be effective in the treatment of acne. Amaldoa. 2008; 15 (1): 149-152.
131. Wagate CG, Mbaria JM, Gakuya DW, Nanyingi MO, Kareru PG, Njuguna A, et al. Screening of some Kenyan medicinal plants for antibacterial activity. *Phytother Res.* 2010; 24 (1): 150-153.
  132. Zampini IC, Cudmani N, Isla MI. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2007; 41 (3): 385-393.
  133. A. Gette M, G. Derita M, Zacchino S, Petenatti E. Actividad antifúngica de especies de la tribu *Helenieae* (*Asteraceae*) del centro-oeste de Argentina. *B Latinoam Caribe Pl.* 2007; 6 (6): 346-347.
  134. Argote-Vega FE, Suárez-Montenegro ZJ, Tobar-Delgado ME, Pérez-Álvarez JA, Hurtado-Benavides AM, Delgado-Ospina J. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotechnol Sector Agropecuario Agroind.* 2017; 2: 52-60.
  135. García Ibarra VA. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos etanólicos totales de cinco especies del género *Baccharis*. Quito, Ecuador, 2007 [Trabajo de Titulación]. Sangolquí: Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército; 2007.
  136. Marín Ocampo AM, López Zuluaga CA, Pérez Cárdenas JE, Isaza Mejía G. Actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* y *Solanum dolichosepalum*. *Biosalud.* 2006; 5: 51-59.
  137. Martínez S, Mollinedo P, Mamani O, Almanza G y Terrazas E. Estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Rev Boliv Quím.* 2011; 28 (1): 35-40.

## IX. ANEXOS

### ANEXO 1

SCREENING FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Baccharis latifolia* Y EL EXTRACTO METANÓLICO DE *Schkuhria pinnata*



**Figura 41.** Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*.



**Figura 42.** Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* (continuación).



**Figura 43.** Reacción de Shinoda para reconocimiento de flavonoides del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*.



**Figura 44.** Marcha fitoquímica del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*.



**Figura 45.** Marcha fitoquímica del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* (continuación).



**Figura 46.** Reacción de Shinoda para reconocimiento de flavonoides del extracto metanólico de *Schkuhria pinnata*.

## ANEXO 2

### CONSTANCIA DE CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Schkuhria pinnata*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

**CONSTANCIA N° 101-USM-2018**

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama con hojas y fruto), recibida de **Fiorella De la Cruz Tito y Aldo Benito Navarro**, estudiante de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

**FAMILIA: ASTERACEAE**

**GENERO: *Schkuhria***

**ESPECIE: *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze**

Nombre vulgar: "Canchalahua".  
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 27 de marzo de 2018

ACE/ddb



**MAG. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



Av. Armado 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:  
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: [muonh@unsm.edu.pe](mailto:muonh@unsm.edu.pe)  
<http://muonh.unsm.edu.pe>



## ANEXO 3

### CONSTANCIA DE CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Baccharis latifolia*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

**CONSTANCIA N° 178-USM-2018**

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril), recibida de Aldo BENITO NAVARRO y Fiorella DE LA CRUZ TITO, estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: *Baccharis latifolia* (R & P) Pers. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

**FAMILIA: ASTERACEAE**

**GENERO: Baccharis**

**ESPECIE: *Baccharis latifolia* (R & P) Pers.**

Nombre vulgar: "Chilca".  
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 09 de mayo de 2018

ACE/ddb



  
**MAG. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Armadillo 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú


Teléfono:  
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: [muherbario@unmsm.edu.pe](mailto:muherbario@unmsm.edu.pe)  
<http://muherbario.unmsm.edu.pe>




## ANEXO 4

### CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE POLIFENOLES TOTALES DE *Baccharis latifolia*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA





**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00307-CPF-2018**

ORDEN DE ANÁLISIS	: 004922/2018
MUESTRA	: MUESTRA B (B.S)
NÚMERO DE LOTE	: —
CANTIDAD	: 01 frasco x 11,8 g
FECHA DE RECEPCIÓN	: 25 de mayo del 2018
FECHA DE FABRICACIÓN	: —
FECHA DE VENCIMIENTO	: —



PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES	—	ESPECTROFOTOMETRÍA UV - Visible	1,99 mg de ácido gálico/mL muestra

Lima, 02 de Julio del 2018


**OF. Gustavo Guerra Brizuela**  
Director del Centro de Control Analítico

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**  
 Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

## ANEXO 5

### CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE POLIFENOLES TOTALES DE *Schkuhria pinnata*




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA

**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00306-CPF-2018**



ORDEN DE ANÁLISIS : 004921/2018



MUESTRA : MUESTRA A (S.P)

CANTIDAD : 01 frasco x 5,5 g

FECHA DE RECEPCIÓN : 25 de mayo del 2018

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES	---	ESPECTROFOTOMETRÍA UV - Visible	0,96 mg de ácido gálico/mL muestra

Lima, 02 de Julio del 2018


**QF. Gustavo Guerra Brizuela**  
Director del Centro de Control Analítico

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú

☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1

E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



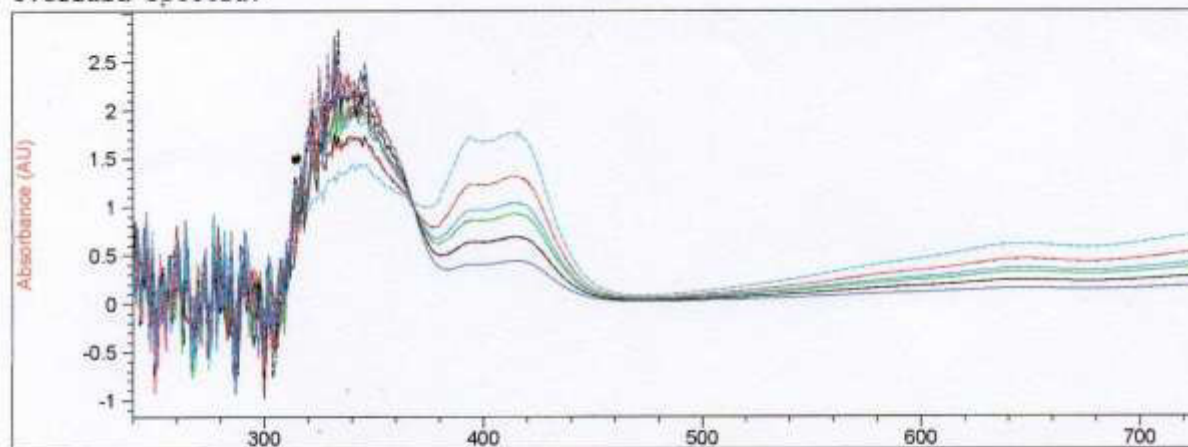
## ANEXO 6

### ESPECTROFOTOGRAMA UV-VIS DE TROLOX POR MÉTODO ABTS

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS EN TROLOX


Method file : ABTS.M ( modified ) Last update: Date 21/03/2019 Time p.m.  
Information : ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS EN TROLOX  
Data File : C:\CHEM32\1\DATA\201808021.SD Created : 8/2/18 16:44:4

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<734nm>	#	Name	Abs<734nm>
1	C1	0.53032	7	C4	0.28219
2	C1	0.53121	8	C4	0.28178
3	C2	0.42423	9	C5	0.18053
4	C2	0.42466	10	C5	0.18112
5	C3	0.37868	11	BLANCO	0.70475
6	C3	0.37898			

Report generated by : FDT

Signature: 

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

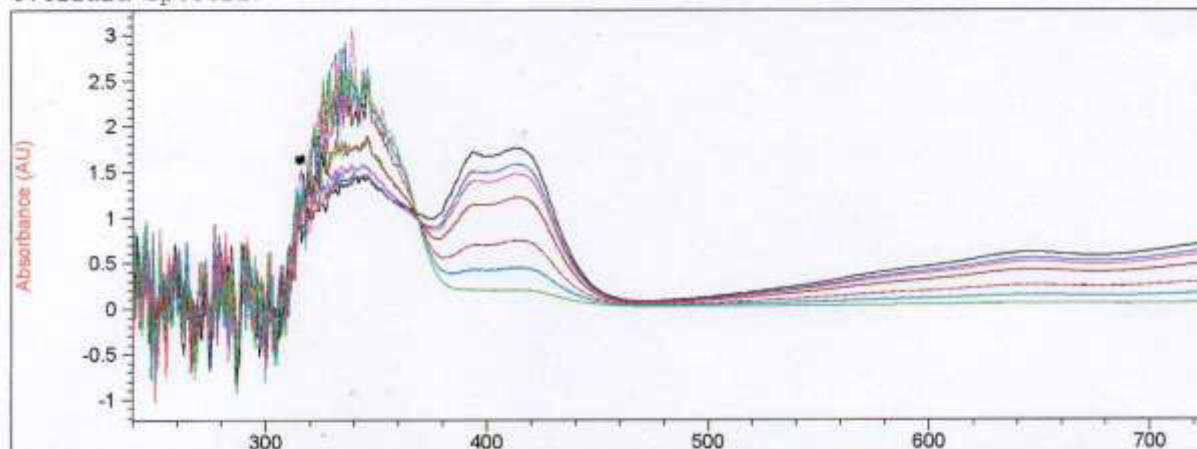
## ANEXO 7

### ESPECTROFOTOGRAMA UV-VIS DE *Baccharis latifolia* POR MÉTODO ABTS

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS EN MUESTRA B.L

Method file : ABTS.M ( modified ) Last update: Date 21/03/2019 Time p.m.  
 Information : ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS EN MUESTRA B.L  
 Data File : C:\CHEM32\1\DATA\201808022.SD Created : 8/2/18 17:32:4

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<734nm>	#	Name	Abs<734nm>
1	BLANCO	0.70475	8	MPB-C4	0.29245
2	MPB-C1	0.63565	9	MPB-C4	0.29060
3	MPB-C1	0.63562	10	MPB-C5	0.16901
4	MPB-C2	0.59358	11	MPB-C5	0.16262
5	MPB-C2	0.59293	12	MPB-C6	6.2129E-2
6	MPB-C3	0.49079	13	MPB-C6	6.1581E-2
7	MPB-C3	0.48913			

Report generated by : FDT

Signature: ..



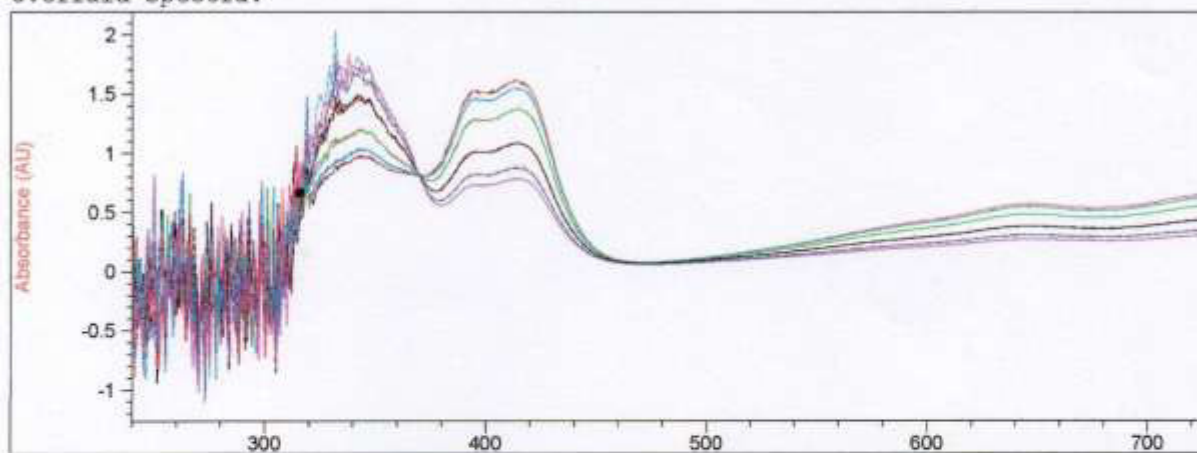
## ANEXO 8

### ESPECTROFOTOGRAMA UV-VIS DE *Schkuhria pinnata* POR MÉTODO ABTS

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS EN MUESTRA S.P


Method file : 201807241.M Last update: Date 22/03/2019 Time 05:34:5  
 Information : ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS EN MUESTRA S.P  
 Data File : C:\Chem32\1\DATA\20180724A.SD Created : 7/24/18 17:18:

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<734nm>	#	Name	Abs<734nm>
1	MPA-C1	0.64886	7	MPA-C4	0.43483
2	MPA-C1	0.64884	8	MPA-C4	0.43469
3	MPA-C2	0.62483	9	MPA-C5	0.34885
4	MPA-C2	0.62420	10	MPA-C5	0.34615
5	MPA-C3	0.55355	11	MPA-C6	0.30667
6	MPA-C3	0.55379	12	MPA-C6	0.30571

Report generated by : FDT

Signature: 

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

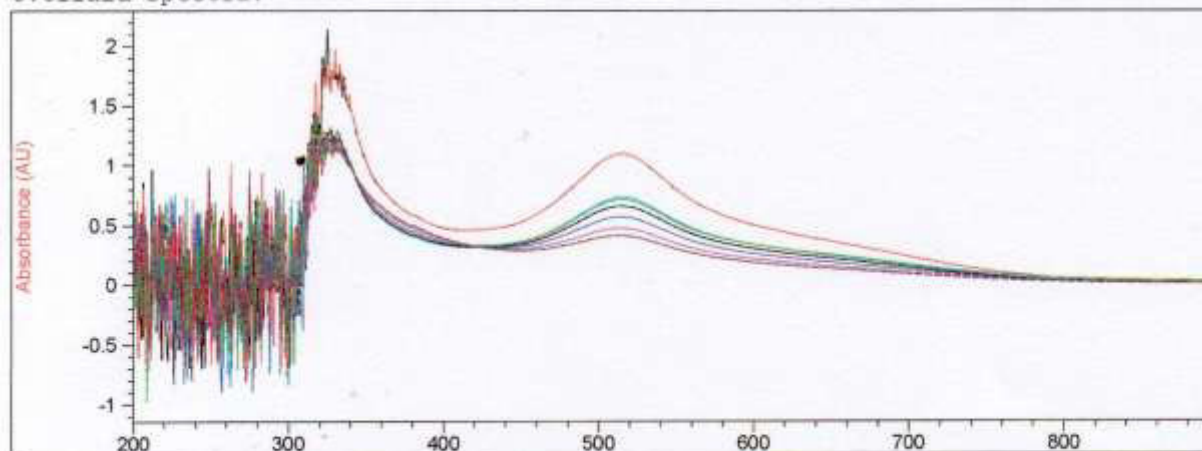
## ANEXO 9

### ESPECTROFOTOGRAMA UV-VIS DE TROLOX POR MÉTODO DPPH

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH EN TROLOX

Method file : DPPH.M ( modified ) Last update: Date 25/02/2019 Time p.m.  
 Information : ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH EN TROLOX  
 Data File : C:\CHEM32\1\DATA\20190225ST.SD Created : 2/25/19 14:34

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<517nm>	#	Name	Abs<517nm>
1	DPPH	1.09370	8	C2	0.65762
2	DPPH	1.09390	9	C3	0.56568
3	B	0.73275	10	C3	0.56601
4	B	0.73300	11	C4	0.47127
5	C1	0.71147	12	C4	0.47189
6	C1	0.71164	13	C5	0.40978
7	C2	0.65791	14	C5	0.40888

Report generated by : FDT

Signature: ..

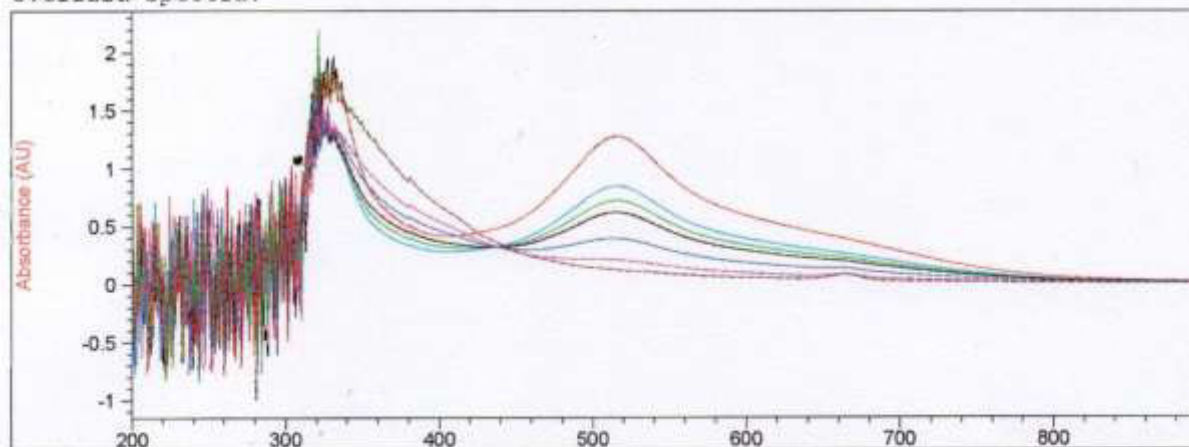
## ANEXO 10

### ESPECTROFOTOGRAMA UV-VIS DE *Schkuhria pinnata* POR MÉTODO DPPH

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH EN MUESTRA S.P


Method file : DPPH.M ( modified ) Last update: Date 25/02/2019 Time p.m.  
 Information : ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH EN MUESTRA S.P  
 Data File : C:\CHEM32\1\DATA\20190225A.SD Created : 2/22/19 11:44:

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<517nm>	#	Name	Abs<517nm>
1	DPPH	1.27340	8	C2-MPA	0.62032
2	DPPH	1.27280	9	C3-MPA	0.39492
3	B	0.84796	10	C3-MPA	0.39401
4	B	0.84742	11	C4-MPA	0.20800
5	C1-MPA	0.72395	12	C4-MPA	0.20927
6	C1-MPA	0.72452	13	C5-MPA	0.12083
7	C2-MPA	0.62064	14	C5-MPA	0.12141

Report generated by : FDT

Signature: 

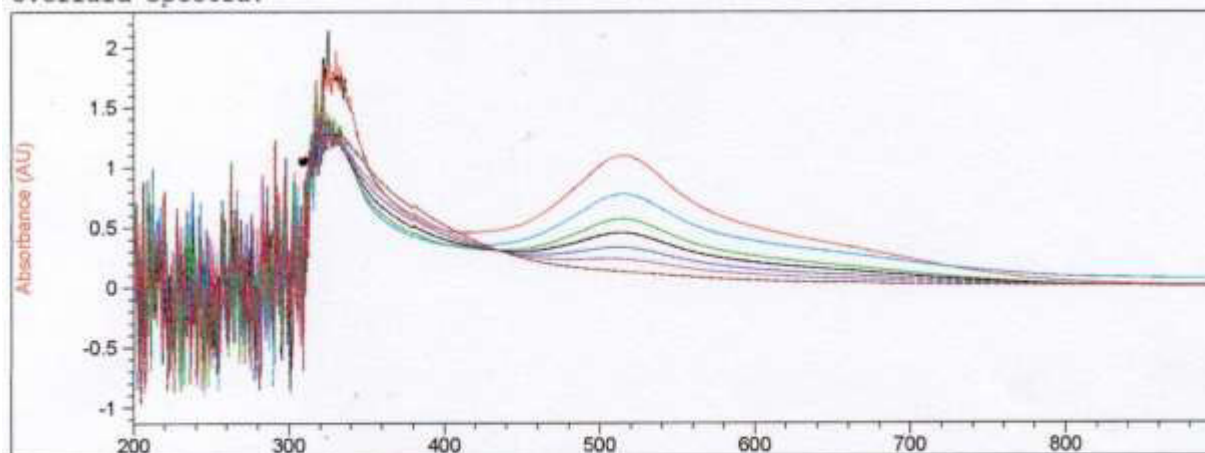
## ANEXO 11

### ESPECTROFOTOGRAMA UV-VIS DE *Baccharis latifolia* POR MÉTODO DPPH

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH EN MUESTRA B.L

Method file : DPPH.M ( modified ) Last update: Date 25/02/2019 Time  
p.m.  
Information : ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH EN MUESTRA B.L  
Data File : C:\CHEM32\1\DATA\20190225B.SD Created : 2/25/19 14:34:2

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<517nm>	#	Name	Abs<517nm>
1	DPPH	1.09370	8	C2-MPB	0.45290
2	DPPH	1.09390	9	C3-MPB	0.33097
3	B	0.77602	10	C3-MPB	0.33103
4	B	0.77642	11	C4-MPB	0.23266
5	C1-MPB	0.57015	12	C4-MPB	0.23130
6	C1-MPB	0.56948	13	C5-MPB	0.12935
7	C2-MPB	0.45170	14	C5-MPB	0.12704

Report generated by : FDT

Signature: ...



## ANEXO 12

### ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MUESTRA A (*Schkuhria pinnata*) POR MÉTODO ABTS

#### ANOVA

#### ABSORBANCIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,285	6	,047	76449,322	,000
Dentro de grupos	,000	7	,000		
Total	,285	13			

Comentarios: El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias entre las absorbancias de acuerdo a las concentraciones trabajadas. ( $p < 0.05$ )

#### COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: Absorbancias  
HSD TUKEY

(I) CONCENTRACION	(J) CONCENTRACION	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/mL	50 ug/mL	.04726000*	0.00078768	,000	0.0441378	0.0503822
	100 ug/mL	.07159500*	0.00078768	,000	0.0684728	0.0747172
	250 ug/mL	.14244000*	0.00078768	,000	0.1393178	0.1455622
	600 ug/mL	.26135000*	0.00078768	,000	0.2582278	0.2644722
	800 ug/mL	.34861000*	0.00078768	,000	0.3454878	0.3517322
	1000 ug/mL	.38992000*	0.00078768	,000	0.3867978	0.3930422
50 ug/mL	0 ug/mL	-.04726000*	0.00078768	,000	-0.0503822	-0.0441378
	100 ug/mL	.02433500*	0.00078768	,000	0.0212128	0.0274572
	250 ug/mL	.09518000*	0.00078768	,000	0.0920578	0.0983022
	600 ug/mL	.21409000*	0.00078768	,000	0.2109678	0.2172122
	800 ug/mL	.30135000*	0.00078768	,000	0.2982278	0.3044722
	1000 ug/mL	.34266000*	0.00078768	,000	0.3395378	0.3457822
100 ug/mL	0 ug/mL	-.07159500*	0.00078768	,000	-0.0747172	-0.0684728
	50 ug/mL	-.02433500*	0.00078768	,000	-0.0274572	-0.0212128
	250 ug/mL	.07084500*	0.00078768	,000	0.0677228	0.0739672
	600 ug/mL	.18975500*	0.00078768	,000	0.1866328	0.1928772
	800 ug/mL	.27701500*	0.00078768	,000	0.2738928	0.2801372
	1000 ug/mL	.31832500*	0.00078768	,000	0.3152028	0.3214472

250 ug/mL	0 ug/mL	-.14244000*	0.00078768	,000	-0.1455622	-0.1393178
	50 ug/mL	-.09518000*	0.00078768	,000	-0.0983022	-0.0920578
	100 ug/mL	-.07084500*	0.00078768	,000	-0.0739672	-0.0677228
	600 ug/mL	.11891000*	0.00078768	,000	0.1157878	0.1220322
	800 ug/mL	.20617000*	0.00078768	,000	0.2030478	0.2092922
	1000 ug/mL	.24748000*	0.00078768	,000	0.2443578	0.2506022
600 ug/mL	0 ug/mL	-.26135000*	0.00078768	,000	-0.2644722	-0.2582278
	50 ug/mL	-.21409000*	0.00078768	,000	-0.2172122	-0.2109678
	100 ug/mL	-.18975500*	0.00078768	,000	-0.1928772	-0.1866328
	250 ug/mL	-.11891000*	0.00078768	,000	-0.1220322	-0.1157878
	800 ug/mL	.08726000*	0.00078768	,000	0.0841378	0.0903822
	1000 ug/mL	.12857000*	0.00078768	,000	0.1254478	0.1316922
800 ug/mL	0 ug/mL	-.34861000*	0.00078768	,000	-0.3517322	-0.3454878
	50 ug/mL	-.30135000*	0.00078768	,000	-0.3044722	-0.2982278
	100 ug/mL	-.27701500*	0.00078768	,000	-0.2801372	-0.2738928
	250 ug/mL	-.20617000*	0.00078768	,000	-0.2092922	-0.2030478
	600 ug/mL	-.08726000*	0.00078768	,000	-0.0903822	-0.0841378
	1000 ug/mL	.04131000*	0.00078768	,000	0.0381878	0.0444322
1000 ug/mL	0 ug/mL	-.38992000*	0.00078768	,000	-0.3930422	-0.3867978
	50 ug/mL	-.34266000*	0.00078768	,000	-0.3457822	-0.3395378
	100 ug/mL	-.31832500*	0.00078768	,000	-0.3214472	-0.3152028
	250 ug/mL	-.24748000*	0.00078768	,000	-0.2506022	-0.2443578
	600 ug/mL	-.12857000*	0.00078768	,000	-0.1316922	-0.1254478
	800 ug/mL	-.04131000*	0.00078768	,000	-0.0444322	-0.0381878

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

## ABSORBANCIAS

HSD TUKEY <sup>a</sup>

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
1000 ug/mL	2	0.30619						
800 ug/mL	2		0.3475					
600 ug/mL	2			0.43476				
250 ug/mL	2				0.55367			
100 ug/mL	2					0.624515		
50 ug/mL	2						0.64885	
0 ug/mL	2							0.69611
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.

## ANEXO 13

### ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MUESTRA B (*Baccharis latifolia*) POR MÉTODO ABTS

#### ANOVA

#### ABSORBANCIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,744	6	,124	36,356,087	,000
Dentro de grupos	,000	7	,000		
Total	,744	13			

Comentarios: El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias entre las absorbancias de acuerdo a las concentraciones trabajadas. ( $p < 0.05$ )

#### COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: Absorbancias

HSD TUKEY

(I) CONCENTRACION	(J) CONCENTRACION	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/mL	50 ug/mL	.06911500*	0.0018465	,000	0.0617958	0.0764342
	100 ug/mL	.11149500*	0.0018465	,000	0.1041758	0.1188142
	250 ug/mL	.21479000*	0.0018465	,000	0.2074708	0.2221092
	600 ug/mL	.41322500*	0.0018465	,000	0.4059058	0.4205442
	800 ug/mL	.53893500*	0.0018465	,000	0.5316158	0.5462542
	1000 ug/mL	.64289500*	0.0018465	,000	0.6355758	0.6502142
50 ug/mL	0 ug/mL	-.06911500*	0.0018465	,000	-0.0764342	-0.0617958
	100 ug/mL	.04238000*	0.0018465	,000	0.0350608	0.0496992
	250 ug/mL	.14567500*	0.0018465	,000	0.1383558	0.1529942
	600 ug/mL	.34411000*	0.0018465	,000	0.3367908	0.3514292
	800 ug/mL	.46982000*	0.0018465	,000	0.4625008	0.4771392
	1000 ug/mL	.57378000*	0.0018465	,000	0.5664608	0.5810992
100 ug/mL	0 ug/mL	-.11149500*	0.0018465	,000	-0.1188142	-0.1041758
	50 ug/mL	-.04238000*	0.0018465	,000	-0.0496992	-0.0350608
	250 ug/mL	.10329500*	0.0018465	,000	0.0959758	0.1106142
	600 ug/mL	.30173000*	0.0018465	,000	0.2944108	0.3090492
	800 ug/mL	.42744000*	0.0018465	,000	0.4201208	0.4347592
	1000 ug/mL	.53140000*	0.0018465	,000	0.5240808	0.5387192

250 ug/mL	0 ug/mL	-.21479000	0.0018465	,000	-0.2221092	-0.2074708
	50 ug/mL	-.14567500	0.0018465	,000	-0.1529942	-0.1383558
	100 ug/mL	-.10329500	0.0018465	,000	-0.1106142	-0.0959758
	600 ug/mL	.19843500	0.0018465	,000	0.1911158	0.2057542
	800 ug/mL	.32414500	0.0018465	,000	0.3168258	0.3314642
	1000 ug/mL	.42810500	0.0018465	,000	0.4207858	0.4354242
600 ug/mL	0 ug/mL	-.41322500	0.0018465	,000	-0.4205442	-0.4059058
	50 ug/mL	-.34411000	0.0018465	,000	-0.3514292	-0.3367908
	100 ug/mL	-.30173000	0.0018465	,000	-0.3090492	-0.2944108
	250 ug/mL	-.19843500	0.0018465	,000	-0.2057542	-0.1911158
	800 ug/mL	.12571000	0.0018465	,000	0.1183908	0.1330292
	1000 ug/mL	.22967000	0.0018465	,000	0.2223508	0.2369892
800 ug/mL	0 ug/mL	-.53893500	0.0018465	,000	-0.5462542	-0.5316158
	50 ug/mL	-.46982000	0.0018465	,000	-0.4771392	-0.4625008
	100 ug/mL	-.42744000	0.0018465	,000	-0.4347592	-0.4201208
	250 ug/mL	-.32414500	0.0018465	,000	-0.3314642	-0.3168258
	600 ug/mL	-.12571000	0.0018465	,000	-0.1330292	-0.1183908
	1000 ug/mL	.10396000	0.0018465	,000	0.0966408	0.1112792
1000 ug/mL	0 ug/mL	-.64289500	0.0018465	,000	-0.6502142	-0.6355758
	50 ug/mL	-.57378000	0.0018465	,000	-0.5810992	-0.5664608
	100 ug/mL	-.53140000	0.0018465	,000	-0.5387192	-0.5240808
	250 ug/mL	-.42810500	0.0018465	,000	-0.4354242	-0.4207858
	600 ug/mL	-.22967000	0.0018465	,000	-0.2369892	-0.2223508
	800 ug/mL	-.10396000	0.0018465	,000	-0.1112792	-0.0966408

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

## ABSORBANCIAS

HSD TUKEY <sup>a</sup>

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
1000 ug/mL	2	0.061855						
800 ug/mL	2		0.165815					
600 ug/mL	2			0.291525				
250 ug/mL	2				0.48996			
100 ug/mL	2					0.593255		
50 ug/mL	2						0.635635	
0 ug/mL	2							0.70475
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.

## ANEXO 14

### ANALISIS DE VARIANZA PARA EL ESTÁNDAR TROLOX POR MÉTODO ABTS

#### ANOVA

#### ABSORBANCIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,343	5	,069	519,239,724	,000
Dentro de grupos	,000	6	,000		
Total	,343	11			

Comentarios: El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias entre las absorbancias de acuerdo a las concentraciones trabajadas. ( $p < 0.05$ )

#### COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: Absorbancias

HSD TUKEY

(I) CONCENTRACION	(J) CONCENTRACION	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/mL	30 ug/mL	.17398500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.1725394	0.1754306
	50 ug/mL	.28030500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.2788594	0.2817506
	60 ug/mL	.32592000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.3244744	0.3273656
	80 ug/mL	.42276500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.4213194	0.4242106
	100 ug/mL	.52392500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.5224794	0.5253706
30 ug/mL	0 ug/mL	-.17398500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.1754306	-0.1725394
	50 ug/mL	.10632000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.1048744	0.1077656
	60 ug/mL	.15193500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.1504894	0.1533806
	80 ug/mL	.24878000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.2473344	0.2502256
	100 ug/mL	.34994000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.3484944	0.3513856
50 ug/mL	0 ug/mL	-.28030500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.2817506	-0.2788594
	30 ug/mL	-.10632000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.1077656	-0.1048744
	60 ug/mL	.04561500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.0441694	0.0470606
	80 ug/mL	.14246000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.1410144	0.1439056
	100 ug/mL	.24362000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.2421744	0.2450656
60 ug/mL	0 ug/mL	-.32592000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.3273656	-0.3244744
	30 ug/mL	-.15193500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.1533806	-0.1504894
	50 ug/mL	-.04561500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.0470606	-0.0441694
	80 ug/mL	.09684500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.0953994	0.0982906
	100 ug/mL	.19800500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.1965594	0.1994506

80 ug/mL	0 ug/mL	-.42276500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.4242106	-0.4213194
	30 ug/mL	-.24878000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.2502256	-0.2473344
	50 ug/mL	-.14246000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.1439056	-0.1410144
	60 ug/mL	-.09684500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.0982906	-0.0953994
	100 ug/mL	.10116000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	0.0997144	0.1026056
100 ug/mL	0 ug/mL	-.52392500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.5253706	-0.5224794
	30 ug/mL	-.34994000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.3513856	-0.3484944
	50 ug/mL	-.24362000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.2450656	-0.2421744
	60 ug/mL	-.19800500 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.1994506	-0.1965594
	80 ug/mL	-.10116000 <sup>*</sup>	0.00036323	,000	-0.1026056	-0.0997144

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

## ABSORBANCIAS

HSD TUKEY <sup>a</sup>

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
100 ug/mL	2	0.180825					
80 ug/mL	2		0.281985				
60 ug/mL	2			0.37883			
50 ug/mL	2				0.424445		
30 ug/mL	2					0.530765	
0 ug/mL	2						0.70475
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.

## ANEXO 15

### ANALISIS DE VARIANZA PARA EL ESTÁNDAR TROLOX POR MÉTODO DPPH

#### ANOVA

#### ABSORBANCIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,174	5	,035	282,443,185	,000
Dentro de grupos	,000	6	,000		
Total	,174	11			

Comentarios: El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias entre las absorbancias de acuerdo a las concentraciones trabajadas. ( $p < 0.05$ )

#### COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: Absorbancias

HSD TUKEY

(I) CONCENTRACION	(J) CONCENTRACION	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/mL	1 ug/mL	.02132000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.0199229	0.0227171
	2 ug/mL	.07511000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.0737129	0.0765071
	5 ug/mL	.16703000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.1656329	0.1684271
	8 ug/mL	.26129500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.2598979	0.2626921
	10 ug/mL	.32354500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.3221479	0.3249421
1 ug/mL	0 ug/mL	-.02132000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.0227171	-0.0199229
	2 ug/mL	.05379000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.0523929	0.0551871
	5 ug/mL	.14571000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.1443129	0.1471071
	8 ug/mL	.23997500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.2385779	0.2413721
	10 ug/mL	.30222500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.3008279	0.3036221
2 ug/mL	0 ug/mL	-.07511000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.0765071	-0.0737129
	1 ug/mL	-.05379000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.0551871	-0.0523929
	5 ug/mL	.09192000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.0905229	0.0933171
	8 ug/mL	.18618500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.1847879	0.1875821
	10 ug/mL	.24843500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.2470379	0.2498321
5 ug/mL	0 ug/mL	-.16703000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.1684271	-0.1656329
	1 ug/mL	-.14571000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.1471071	-0.1443129
	2 ug/mL	-.09192000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.0933171	-0.0905229
	8 ug/mL	.09426500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.0928679	0.0956621
	10 ug/mL	.15651500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.1551179	0.1579121

8 ug/mL	0 ug/mL	-.26129500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.2626921	-0.2598979
	1 ug/mL	-.23997500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.2413721	-0.2385779
	2 ug/mL	-.18618500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.1875821	-0.1847879
	5 ug/mL	-.09426500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.0956621	-0.0928679
	10 ug/mL	.06225000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	0.0608529	0.0636471
10 ug/mL	0 ug/mL	-.32354500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.3249421	-0.3221479
	1 ug/mL	-.30222500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.3036221	-0.3008279
	2 ug/mL	-.24843500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.2498321	-0.2470379
	5 ug/mL	-.15651500 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.1579121	-0.1551179
	8 ug/mL	-.06225000 <sup>*</sup>	0.00035105	,000	-0.0636471	-0.0608529

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

## ABSORBANCIAS

HSD TUKEY <sup>a</sup>

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
10 ug/mL	2	0.40933	0.47158	0.565845	0.657765	0.711555	0.732875
8 ug/mL	2						
5 ug/mL	2						
2 ug/mL	2						
1 ug/mL	2						
0 ug/mL	2						
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.



## ANEXO 16

### ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA MUESTRA A (*Schkuhria pinnata*) POR MÉTODO DPPH

#### ANOVA

#### ABSORBANCIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,848	5	,170	582,249,062	,000
Dentro de grupos	,000	6	,000		
Total	,848	11			

Comentarios: El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias entre las absorbancias de acuerdo a las concentraciones trabajadas. ( $p < 0.05$ )

#### COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: Absorbancias

HSD TUKEY

(I) CONCENTRACION	(J) CONCENTRACION	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/mL	50 ug/mL	.12345500*	0.00053978	,000	0.1213068	0.1256032
	100 ug/mL	.22721000*	0.00053978	,000	0.2250618	0.2293582
	250 ug/mL	.45322500*	0.00053978	,000	0.4510768	0.4553732
	350 ug/mL	.63905500*	0.00053978	,000	0.6369068	0.6412032
	400 ug/mL	.72657000*	0.00053978	,000	0.7244218	0.7287182
50 ug/mL	0 ug/mL	-.12345500*	0.00053978	,000	-0.1256032	-0.1213068
	100 ug/mL	.10375500*	0.00053978	,000	0.1016068	0.1059032
	250 ug/mL	.32977000*	0.00053978	,000	0.3276218	0.3319182
	350 ug/mL	.51560000*	0.00053978	,000	0.5134518	0.5177482
	400 ug/mL	.60311500*	0.00053978	,000	0.6009668	0.6052632
100 ug/mL	0 ug/mL	-.22721000*	0.00053978	,000	-0.2293582	-0.2250618
	50 ug/mL	-.10375500*	0.00053978	,000	-0.1059032	-0.1016068
	250 ug/mL	.22601500*	0.00053978	,000	0.2238668	0.2281632
	350 ug/mL	.41184500*	0.00053978	,000	0.4096968	0.4139932
	400 ug/mL	.49936000*	0.00053978	,000	0.4972118	0.5015082
250 ug/mL	0 ug/mL	-.45322500*	0.00053978	,000	-0.4553732	-0.4510768
	50 ug/mL	-.32977000*	0.00053978	,000	-0.3319182	-0.3276218
	100 ug/mL	-.22601500*	0.00053978	,000	-0.2281632	-0.2238668
	350 ug/mL	.18583000*	0.00053978	,000	0.1836818	0.1879782
	400 ug/mL	.27334500*	0.00053978	,000	0.2711968	0.2754932

350 ug/mL	0 ug/mL	-.63905500*	0.00053978	,000	-0.6412032	-0.6369068
	50 ug/mL	-.51560000*	0.00053978	,000	-0.5177482	-0.5134518
	100 ug/mL	-.41184500*	0.00053978	,000	-0.4139932	-0.4096968
	250 ug/mL	-.18583000*	0.00053978	,000	-0.1879782	-0.1836818
	400 ug/mL	.08751500*	0.00053978	,000	0.0853668	0.0896632
400 ug/mL	0 ug/mL	-.72657000*	0.00053978	,000	-0.7287182	-0.7244218
	50 ug/mL	-.60311500*	0.00053978	,000	-0.6052632	-0.6009668
	100 ug/mL	-.49936000*	0.00053978	,000	-0.5015082	-0.4972118
	250 ug/mL	-.27334500*	0.00053978	,000	-0.2754932	-0.2711968
	350 ug/mL	-.08751500*	0.00053978	,000	-0.0896632	-0.0853668

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

## ABSORBANCIAS

HSD TUKEY <sup>a</sup>

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
400 ug/mL	2	0.12112					
350 ug/mL	2		0.208635				
250 ug/mL	2			0.394465			
100 ug/mL	2				0.62048		
50 ug/mL	2					0.724235	
0 ug/mL	2						0.84769
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.

## ANEXO 17

### ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MUESTRA B (*Baccharis latifolia*) POR MÉTODO DPPH

#### ANOVA

#### ABSORBANCIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,557	5	,111	144,780,542	,000
Dentro de grupos	,000	6	,000		
Total	,557	11			

Comentarios: El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias entre las absorbancias de acuerdo a las concentraciones trabajadas. ( $p < 0.05$ )

#### COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: Absorbancias

HSD TUKEY

(I) CONCENTRACION	(J) CONCENTRACION	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/mL	25 ug/mL	.20640500*	0.00087741	,000	0.202913	0.209897
	50 ug/mL	.32392000*	0.00087741	,000	0.320428	0.327412
	75 ug/mL	.44522000*	0.00087741	,000	0.441728	0.448712
	100 ug/mL	.54424000*	0.00087741	,000	0.540748	0.547732
	125 ug/mL	.64802500*	0.00087741	,000	0.644533	0.651517
25 ug/mL	0 ug/mL	-.20640500*	0.00087741	,000	-0.209897	-0.202913
	50 ug/mL	.11751500*	0.00087741	,000	0.114023	0.121007
	75 ug/mL	.23881500*	0.00087741	,000	0.235323	0.242307
	100 ug/mL	.33783500*	0.00087741	,000	0.334343	0.341327
	125 ug/mL	.44162000*	0.00087741	,000	0.438128	0.445112
50 ug/mL	0 ug/mL	-.32392000*	0.00087741	,000	-0.327412	-0.320428
	25 ug/mL	-.11751500*	0.00087741	,000	-0.121007	-0.114023
	75 ug/mL	.12130000*	0.00087741	,000	0.117808	0.124792
	100 ug/mL	.22032000*	0.00087741	,000	0.216828	0.223812
	125 ug/mL	.32410500*	0.00087741	,000	0.320613	0.327597
75 ug/mL	0 ug/mL	-.44522000*	0.00087741	,000	-0.448712	-0.441728
	25 ug/mL	-.23881500*	0.00087741	,000	-0.242307	-0.235323
	50 ug/mL	-.12130000*	0.00087741	,000	-0.124792	-0.117808
	100 ug/mL	.09902000*	0.00087741	,000	0.095528	0.102512
	125 ug/mL	.20280500*	0.00087741	,000	0.199313	0.206297

100 ug/mL	0 ug/mL	-.54424000 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.547732	-0.540748
	25 ug/mL	-.33783500 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.341327	-0.334343
	50 ug/mL	-.22032000 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.223812	-0.216828
	75 ug/mL	-.09902000 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.102512	-0.095528
	125 ug/mL	.10378500 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	0.100293	0.107277
125 ug/mL	0 ug/mL	-.64802500 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.651517	-0.644533
	25 ug/mL	-.44162000 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.445112	-0.438128
	50 ug/mL	-.32410500 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.327597	-0.320613
	75 ug/mL	-.20280500 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.206297	-0.199313
	100 ug/mL	-.10378500 <sup>*</sup>	0.00087741	,000	-0.107277	-0.100293

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

## ABSORBANCIAS

### HSD TUKEY <sup>a</sup>

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
125 ug/mL	2	0.128195					
100 ug/mL	2		0.23198				
75 ug/mL	2			0.331			
50 ug/mL	2				0.4523		
25 ug/mL	2					0.569815	
0 ug/mL	2						0.77622
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.